

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE  
DE LISBOA



AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE UM DESCONTAMINANTE DE PARTÍCULAS OXIDANTES  
APLICADO POR AEROSSOL GASOSO EM ESPOROS DE *Bacillus cereus*

AMIN HENRIQUE TAVARES TAOUFIQ

ORIENTADORA:

Doutora Ana Rita Barroso Cunha de Sá  
Henriques

TUTOR:

Major Wilson David Talhão Antunes

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE  
DE LISBOA



AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE UM DESCONTAMINANTE DE PARTÍCULAS OXIDANTES  
APLICADO POR AEROSSOL GASOSO EM ESPOROS DE *Bacillus cereus*

AMIN HENRIQUE TAVARES TAOUFIQ

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

JÚRI

PRESIDENTE:

Doutor António Salvador Ferreira Henriques  
Barreto

VOGAIS:

Doutora Marília Catarina Leal Fazeres  
Ferreira  
Doutora Ana Rita Barroso Cunha de Sá  
Henriques

ORIENTADORA:

Doutora Ana Rita Barroso Cunha de Sá  
Henriques

TUTOR:

Major Wilson David Talhão Antunes

### Anexo 3 – DECLARAÇÃO RELATIVA ÀS CONDIÇÕES DE REPRODUÇÃO DA TESE OU DISSERTAÇÃO

Nome: Amin Henrique Tavares Taoufiq

Título da Tese ou  
Dissertação: Avaliação da eficácia de um descontaminante de partículas oxidantes aplicado por aerossol gasoso em esporos de *Bacillus cereus*

Ano de conclusão (indicar o da data da realização das provas públicas): 2021

Designação do curso  
de Mestrado ou de  
Doutoramento: Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Área científica em que melhor se enquadra (assinale uma):

- ☐ Clínica ☒ Produção Animal e Segurança Alimentar  
☐ Morfologia e Função ☐ Sanidade Animal

Declaro sobre compromisso de honra que a tese ou dissertação agora entregue corresponde à que foi aprovada pelo júri constituído pela Faculdade de Medicina Veterinária da ULISBOA.

Declaro que concedo à Faculdade de Medicina Veterinária e aos seus agentes uma licença não-exclusiva para arquivar e tornar acessível, nomeadamente através do seu repositório institucional, nas condições abaixo indicadas, a minha tese ou dissertação, no todo ou em parte, em suporte digital.

Declaro que autorizo a Faculdade de Medicina Veterinária a arquivar mais de uma cópia da tese ou dissertação e a, sem alterar o seu conteúdo, converter o documento entregue, para qualquer formato de ficheiro, meio ou suporte, para efeitos de preservação e acesso.

Retenho todos os direitos de autor relativos à tese ou dissertação, e o direito de a usar em trabalhos futuros (como artigos ou livros).

Concordo que a minha tese ou dissertação seja colocada no repositório da Faculdade de Medicina Veterinária com o seguinte estatuto (assinale um):

- ☒ Disponibilização imediata do conjunto do trabalho para acesso mundial;
- ☐ Disponibilização do conjunto do trabalho para acesso exclusivo na Faculdade de Medicina Veterinária durante o período de ☐ 6 meses, ☐ 12 meses, sendo que após o tempo assinalado autorizo o acesso mundial\*;

Nos exemplares das dissertações de mestrado ou teses de doutoramento entregues para a prestação de provas na Universidade e dos quais é obrigatoriamente enviado um exemplar para depósito na Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa deve constar uma das seguintes declarações (incluir apenas uma das três):

1. É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
2. É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA TESE/TRABALHO (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
3. DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TESE/TRABALHO.

Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, 16 de setembro de 2021

(indicar aqui a data da realização das provas públicas)

Assinatura: Amin Taoufiq

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Major Wilson Antunes, pela sua ajuda e toda a orientação prestada ao longo do estágio, pela sua partilha de conhecimento e pelo seu incansável suporte e apoio na elaboração desta dissertação.

À Professora Doutora Ana Rita Henriques pela sua ajuda, conselhos, disponibilidade e empenho na elaboração desta tese, o meu sincero agradecimento.

Ao senhor Paulo, à Dra. Verónica, ao segundo-sargento Vieira, ao Alferes Gil, ao Alferes Bem, ao Alferes Carvalho, ao Tenente Barbosa, à Major Gomes, ao Major Alonso, ao Major Antunes, ao Tenente-Coronel Freitas, ao Tenente-Coronel Carvalho e ao Tenente-Coronel João pela forma como me acolheram e trataram no LDBDE.

Ao Major Coimbra, pelo seu enorme apoio e motivação.

Ao Fadhil, à Margarida, e ao pessoal da Delox.

A todos os meus amigos que sempre me acompanharam ao longo do curso.

Aos meus pais, ao meu irmão e à Gabyzinha por sempre me terem encorajado a perseverar nas minhas ambições e por serem um pilar fundamental na minha vida.

À Beatriz pelo seu apoio incondicional e pela ajuda não só na elaboração deste trabalho, mas ao longo de todo o meu percurso.

Por fim, ao Gastão, em sua honra e eterna memória.

## RESUMO

Assiste-se na atualidade a uma necessidade crescente de desenvolver novos métodos de descontaminação, uma vez que os métodos convencionais são insuficientes para eliminar agentes patogénicos resistentes. O projeto “Descontaminação por Aerossol Gasoso de Partículas Oxidantes” (DRACO), desenvolvido pela Unidade Militar Laboratorial de Defesa Biológica e Química, em parceria com o Centro de Investigação da Academia Militar, tem por objetivos testar e desenvolver abordagens inovadoras para a descontaminação operacional.

Neste âmbito pretende testar a eficácia de um novo descontaminante, baseado em nano partículas oxidantes. A tecnologia em teste, designada por dryVHP (formulação sólida de peróxido de hidrogénio vaporizado) foi desenvolvida pela Delox, uma *startup* inovadora da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. Esta tecnologia tem como objetivo permitir a criação de uma nova geração de sistemas de descontaminação com maior compatibilidade para materiais e eletrónica, permitindo também a redução do impacto ambiental e redução dos recursos humanos em cenários de contaminação biológica. Pretende-se que esta tecnologia seja empregue em áreas civis na descontaminação de infraestruturas, mas também na descontaminação de interiores, edifícios e viaturas militares.

Deste modo, propomo-nos neste trabalho testar a eficácia deste novo descontaminante, comparando o seu potencial esporicida ao de outros descontaminantes líquidos (peróxido de hidrogénio líquido a 10% e ácido peracético a 0.1%), recorrendo ao uso de esporos de *Bacillus cereus*, como substituto de *Bacillus anthracis*. A estirpe de *B. cereus* NCTC 11143 estudada neste trabalho produz duas frações de esporos, do topo e do fundo, que se diferenciam entre si essencialmente pelas suas propriedades físico-químicas, nomeadamente a nível da hidrofobicidade. As experiências de descontaminação foram efetuadas com estas subpopulações de esporos de *B. cereus* em separado e testaram-se duas superfícies de plástico diferentes, uma limpa e outra suja com óleo alimentar.

O peróxido de hidrogénio líquido a 10% e o ácido peracético a 0.1% demonstraram ação esporicida para as duas frações de esporos de *B. cereus* tanto quando aplicado em superfícies limpas, como em superfícies sujas. Por outro lado, *dryVHP*, disperso por vaporização pela Delox demonstrou-se apenas eficaz na descontaminação dos esporos do fundo (hidrofílicos), não exercendo ação esporicida nos esporos do topo (hidrofóbicos). Pensa-se que a diferente hidrofobicidade das duas frações de esporos esteja relacionada com as suas resistências diferenciais aos descontaminantes testados.

O presente estudo permitiu destacar que o modo de aplicação do descontaminante é um fator condicionante do mecanismo de ação das substâncias ativas oxidantes, e contribuiu para aumentar o conhecimento no âmbito da descontaminação de esporos de *B. cereus*.

**Palavras-chave:** Descontaminação; *Bacillus cereus*; endósporos; peróxido de hidrogénio;

## ABSTRACT

Nowadays, there is a growing need to develop new decontamination methods since conventional ones are insufficient to eliminate resistant pathogens.

The "Decontamination by Aerosol Gas Decontamination of Oxidizing Particles" (DRACO) project, developed by the Biological Defense and Chemical Laboratory Unit in partnership with the Military Academy Research Center, aims to test and develop innovative approaches for operational decontamination. In this context, the main goal is to test the effectiveness of a new decontaminant, based on oxidizing nanoparticles.

The decontaminant technology under test is called dryVHP (a solid formulation of vaporized hydrogen peroxide) and was developed by Delox, an innovative start-up from the Faculty of Science of the University of Lisbon. This technology aims to provide the creation of a new generation of decontamination systems with greater compatibility for materials and electronics, also allowing the reduction of environmental impact and reduction of human resources in biological contamination scenarios. This technology is intended to be used in civilian areas in the decontamination of infrastructures, but also in the decontamination of interiors, buildings, and military vehicles.

Thus, the purpose of this work is to test the effectiveness of this new decontaminant, comparing its sporicidal potential to other liquid decontaminants (liquid hydrogen peroxide at 10% and peracetic acid at 0.1%), using *Bacillus cereus* spores as a substitute for *Bacillus anthracis*. The strain of *B. cereus* NCTC 11143 studied in this work produces two fractions of endospores, the top and bottom fraction, which differ essentially by their physicochemical properties, namely hydrophobicity. The decontamination experiments were carried out with these separate *B. cereus* spore subpopulations and two different plastic surfaces were tested, a clean one and a soiled one with cooking oil.

Liquid hydrogen peroxide at 10% and peracetic acid at 0.1% were shown to possess sporicidal action for both subpopulations of *B. cereus* spores when applied to clean and dirty surfaces. On the other hand, gaseous hydrogen peroxide (dryVHP) dispersed by vaporization by Delox was shown to be effective only in decontaminating bottom (hydrophilic) spores and did not exert sporicidal action on the spores of the top (hydrophobic). The different surface hydrophobicity these two spore fractions carry is thought to be responsible for their differential resistances with the decontaminants tested.

The present study highlighted that the application method of the decontaminant is a conditioning factor on the mechanism of action of the oxidizing active substances and contributed to increase knowledge in the field of decontamination of *B. cereus* spores.

**Keywords:** Decontamination; *Bacillus cereus*; bacterial spores; hydrogen peroxide.

## Índice

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 1.     | Relatório de atividades .....  | 1  |
| 2.     | Revisão Bibliográfica .....  | 2  |
| 2.1.   | Conceitos gerais sobre descontaminação microbiana.....   | 2  |
| 2.2.   | Necessidades práticas da descontaminação .....   | 5  |
| 2.3.   | Endósporos bacterianos .....   | 7  |
| 2.3.1. | Estrutura e propriedades físico-químicas .....   | 8  |
| 2.3.2. | <i>Bacillus cereus</i> e sua importância .....   | 10 |
| 2.4.   | Tipologias de descontaminantes, modos de aplicação e fatores que influenciam a descontaminação .....               | 11 |
| 2.4.1. | Metodologias de aplicação em vigor, aspetos positivos e negativos de cada tipo de metodologia. ....                | 12 |
| 2.4.2. | Fatores que influenciam a descontaminação .....  | 14 |
| 2.4.3. | Limitações e condicionantes identificados nas metodologias químicas em vigor relativamente à descontaminação ..... | 15 |
| 2.5.   | Enquadramento da dissertação no projeto DRACO .....  | 16 |
| 3.     | Objetivos .....  | 17 |
| 4.     | Material e Métodos .....   | 17 |
| 4.1.   | Documentos normativos e metodologia de testagem de descontaminantes .....  | 17 |
| 4.2.   | Estirpe utilizada e crescimento bacteriano .....   | 18 |
| 4.3.   | Meios de cultura.....  | 18 |
| 4.4.   | Tampão fosfato salino.....   | 18 |
| 4.5.   | Tampão de TritonX 0.5% em fosfato salino.....  | 18 |
| 4.6.   | Solução de diluição de TritonX 0.1% em meio de infusão coração-cérebro .....                                       | 19 |
| 4.7.   | Preparação e quantificação de suspensões de esporos de <i>B. cereus</i> .....                                      | 19 |
| 4.8.   | Separação das subpopulações de esporos de <i>B. cereus</i> .....   | 19 |
| 4.9.   | Preparação das matrizes para descontaminação.....  | 20 |
| 4.10.  | Quantificação dos esporos de <i>B. cereus</i> .....  | 20 |
| 4.11.  | Preparação do inibidor da descontaminação .....  | 21 |
| 4.12.  | Ácido peracético a 0.1% .....  | 21 |
| 4.13.  | Peróxido de hidrogénio líquido a 10%.....  | 21 |
| 4.14.  | Peróxido de hidrogénio gasoso.....   | 21 |
| 4.15.  | Descontaminação por dryVHP .....   | 21 |
| 4.16.  | Recuperação dos esporos de <i>B. cereus</i> após descontaminação .....   | 22 |
| 4.17.  | Microscopia ótica de contraste de fase .....   | 22 |
| 4.18.  | Microscopia eletrónica de varrimento.....  | 22 |
| 4.19.  | Análise estatística .....  | 23 |
| 5.     | Resultados .....   | 23 |
| 6.     | Discussão.....   | 34 |
| 7.     | Conclusões.....  | 41 |

|   |    |
|---|----|
| 8. Referências Bibliográficas .....   | 42 |
| 9. Anexos .....   | 45 |
| 9.1. Anexo 1: Resultados da descontaminação dos esporos do topo de <i>B. cereus</i> NCTC 11143 com o peróxido de hidrogénio líquido a 10% e respetivo controlo positivo em superfícies limpas.....                                  | 45 |
| 9.2. Anexo 2: Resultados da descontaminação dos esporos do fundo de <i>B. cereus</i> NCTC 11143 com o peróxido de hidrogénio líquido a 10% e respetivo controlo positivo em superfícies limpas.....                                 | 46 |
| 9.3. Anexo 3: Resultados da descontaminação dos esporos do topo de <i>B. cereus</i> NCTC 11143 com o peróxido de hidrogénio líquido a 10% e respetivo controlo positivo em superfícies sujas com óleo alimentar.....                | 47 |
| 9.4. Anexo 4: Resultados da descontaminação dos esporos do fundo de <i>B. cereus</i> NCTC 11143 com o peróxido de hidrogénio líquido a 10% e respetivo controlo positivo em superfícies sujas com óleo alimentar.....               | 47 |
| 9.5. Anexo 5: Resultados da descontaminação dos esporos do topo de <i>B. cereus</i> NCTC 11143 com o ácido peracético líquido a 0.1% (controlo padrão) e respetivo controlo positivo em superfícies limpas.....                     | 49 |
| 9.6. Anexo 6: Resultados da descontaminação dos esporos do fundo de <i>B. cereus</i> NCTC 11143 com o ácido peracético líquido a 0.1% (controlo padrão), e respetivo controlo positivo em superfícies limpas.....                   | 50 |
| 9.7. Anexo 7: Resultados da descontaminação dos esporos do topo de <i>B. cereus</i> NCTC 11143 com o ácido peracético líquido a 0.1% (controlo padrão), e respetivo controlo positivo em superfícies sujas com óleo alimentar.....  | 51 |
| 9.8. Anexo 8: Resultados da descontaminação dos esporos do fundo de <i>B. cereus</i> NCTC 11143 com o ácido peracético líquido a 0.1% (controlo padrão), e respetivo controlo positivo em superfícies sujas com óleo alimentar..... | 52 |
| 9.9. Anexo 9: Resultados da descontaminação dos esporos do topo de <i>B. cereus</i> NCTC 11143 com dryVHP e respetivo controlo positivo, em superfícies limpas.....   | 53 |
| 9.10. Anexo 10: Resultados da descontaminação dos esporos do fundo de <i>B. cereus</i> NCTC 11143 com dryVHP e respetivo controlo positivo, em superfícies limpas.....  | 54 |
| 9.11. Anexo 11: Resultados da descontaminação dos esporos do topo de <i>B. cereus</i> NCTC 11143 com dryVHP e respetivo controlo positivo, em superfícies sujas com óleo alimentar.....   | 55 |
| 9.12. Anexo 12: Resultados da descontaminação dos esporos do fundo de <i>B. cereus</i> NCTC 11143 com dryVHP e respetivo controlo positivo, em superfícies sujas com óleo alimentar.....  | 56 |
| 9.13. Anexo 13: Resultados da descontaminação do controlo negativo em superfícies limpas  | 56 |
| 9.14. Anexo 14: Resultados da descontaminação do controlo negativo em superfícies sujas com óleo alimentar.....   | 57 |
| 9.15. Anexo 15: Análise estatística dos esporos do topo de <i>B. cereus</i> NCTC 11143 após descontaminação por dryVHP em SL e SS.....  | 57 |
| 9.16. Anexo 16: Análise estatística dos esporos do fundo de <i>B. cereus</i> NCTC 11143 após descontaminação por dryVHP em SL e SS.....   | 58 |



## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1: Representação gráfica de alguns microrganismos com resistência descrita a determinados biocidas (original).....   | 3  |
| Figura 2: Estrutura do esporo da estirpe NCTC 11143 de <i>B. cereus</i> . 2A: Microscopia eletrônica de transmissão. 2B: Microscopia eletrônica de varrimento.....  | 10 |
| Figura 3: Purificação das subpopulações dos esporos de <i>B. cereus</i> estirpe NCTC 11143. 3A: População total de esporos em ADE. 3B: Fração de esporos do topo (esporos hidrofóbicos) após purificação em ADE. 3C: Fração de esporos do fundo (esporos hidrofílicos) após purificação em ADE.....   | 24 |
| Figura 4: Caracterização das subpopulações de esporos de <i>B. cereus</i> estirpe NCTC 11143 por microscopia ótica e microscopia eletrônica de varrimento. 4A: Esporos do topo por microscopia ótica de contraste de fase. 4B: Esporos do fundo por microscopia ótica de contraste de fase. 4C: Esporos do topo por microscopia eletrônica de varrimento. 4D: Esporos do fundo por microscopia eletrônica de varrimento. .... | 25 |
| Figura 5: Placas de PCA incubadas com esporos do fundo de <i>B. cereus</i> , oriundos de matriz tratada com óleo alimentar e descontaminadas com peróxido de hidrogénio líquido a 10%.26  |    |
| Figura 6: Resultados da descontaminação com peróxido de hidrogénio líquido a 10% das subpopulações de esporos de <i>B. cereus</i> estirpe NCTC 11143. 6A - Percentagem de redução dos esporos do topo. 6B - Percentagem de redução dos esporos do fundo. 6C – ufc/mL dos esporos do topo. 6D – ufc/mL dos esporos do fundo.....   | 27 |
| Figura 7: Aparelhos de descontaminação da Delox. 7A: Câmara de isolamento dentro da qual se realiza a descontaminação por dryVHP. 7B: Equipamento portátil de descontaminação desenvolvido pela Delox que dispersa o dryVHP por aerossolização. ....  | 28 |
| Figura 8: Placas de PCA incubadas com esporos do topo de <i>B. cereus</i> , oriundos de matriz tratada com óleo alimentar e descontaminadas com peróxido de hidrogénio gasoso (dryVHP). ....  | 29 |
| Figura 9: 9A: Percentagem de redução dos esporos do topo de <i>B. cereus</i> , após descontaminação com peróxido de hidrogénio gasoso (dryVHP). 9B: Contagens das ufc/mL dos esporos do topo de <i>B. cereus</i> com os respetivos controlos positivos, após descontaminação com peróxido de hidrogénio gasoso (dryVHP).....  | 30 |
| Figura 10: Placas de PCA incubadas com esporos do fundo de <i>B. cereus</i> , oriundos de matriz em superfície limpa e descontaminadas com peróxido de hidrogénio gasoso (dryVHP). ....   | 32 |
| Figura 11: 11A: Percentagem de redução dos esporos do fundo de <i>B. cereus</i> , após descontaminação com peróxido de hidrogénio gasoso (dryVHP). 11B: Contagens das ufc/mL dos esporos do fundo de <i>B. cereus</i> com os respetivos controlos positivos, após descontaminação com peróxido de hidrogénio gasoso (dryVHP).....   | 33 |
| Figura 12: Diferente padrão de glicosilação do exósporo da estirpe de <i>B. cereus</i> NCTC 11143, entre as frações do topo e do fundo. 12A: Microscopia eletrônica de transmissão dos esporos do topo. 12B: Microscopia eletrônica de transmissão dos esporos do fundo. ....   | 36 |

## ÍNDICE DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1: Métodos de desinfecção e esterilização e exemplos de aplicações (Kothekar 2020).<br>.....   | 5  |
| Tabela 2: Exemplos de bactérias formadoras de esporos (McDonnell 2017). ....  | 8  |
| Tabela 3: Quantificação de ambas as subpopulações de esporos de <i>B. cereus</i> .....  | 26 |
| Tabela 4: Valores das ufc/mL dos esporos do topo de <i>B. cereus</i> após descontaminação com peróxido de hidrogénio gasoso (dryVHP) nas duas superfícies em análise.....   | 31 |
| Tabela 5: Valores das ufc/mL dos esporos do fundo de <i>B. cereus</i> após descontaminação com peróxido de hidrogénio gasoso (dryVHP) nas duas superfícies em análise. .... | 34 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|          |   |
|----------|---|
| ADE      | Água Destilada Estéril  |
| ADN      | Ácido Desoxirribonucleico                                     |
| BHI      | Infusão coração-cérebro                                       |
| BHIT     | Infusão coração-cérebro com TritonX a 0.1%                    |
| COVID-19 | Doença por SARS Coronavírus 2                                 |
| CINAMIL  | Centro de Investigação da Academia Militar                    |
| DRACO    | Descontaminação por Aerossol Gasoso de Partículas Oxidantes   |
| dryVHP   | Formulação sólida de Peróxido de hidrogénio gasoso vaporizado |
| HPV      | Vapor de peróxido de hidrogénio                               |
| LBDB     | Laboratório de Bromatologia e Defesa Biológica                |
| LBDBE    | Laboratório de Bromatologia e Defesa Biológica do Exército    |
| NBQR     | Nuclear, Biológica, Química e Radiológica                     |
| PCA      | <i>Plate Count Agar</i>                                       |
| PBS      | Tampão fosfato salino   |
| PBST     | Tampão fosfato salino com TritonX a 0.5%                      |
| RPM      | Rotações por minuto   |
| SL       | Superfícies limpas  |
| SS       | Superfícies sujas com óleo alimentar                          |
| TEM      | Microscopia Eletrónica de Transmissão                         |
| ufc/mL   | Unidades Formadoras de Colónias por mililitro                 |
| UMLDBQ   | Unidade Militar Laboratorial de Defesa Biológica e Química    |
| UV       | Ultravioleta  |
| VHP      | Peróxido de hidrogénio gasoso vaporizado                      |
| $\gamma$ | Gama  |

## 1. RELATÓRIO DE ATIVIDADES

O estágio de final de curso encontra-se inserido no tirocínio de promoção a Oficial de Medicina Veterinária da Academia Militar, que se divide em duas fases:

Numa primeira fase, pela realização do estágio curricular que serve de base a esta dissertação de mestrado integrado, com a duração de um semestre (14 de setembro de 2020 até 31 de março de 2021), realizado no Laboratório de Bromatologia e Defesa Biológica do Exército português (LBDBE), no Prior Velho. O estágio teve início em setembro de 2020 com a participação nos trabalhos de diagnóstico laboratorial de SARS-CoV2 por RT-PCR, o que permitiu a familiarização com as técnicas e procedimentos laboratoriais implementados. A partir de outubro de 2020, sob a orientação do Major Médico Veterinário Wilson Antunes, foi possível iniciar o presente trabalho, que tem por base o projeto DRACO. Durante este período, o trabalho de investigação focou-se na descontaminação de bactérias de *Bacillus cereus*, da estirpe NCTC 11143. As experiências de descontaminação foram efetuadas *in vitro*, em condições laboratoriais, nas instalações do LBDBE. Nesta fase, a *spin-off* Delox, com sede na Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, no Campo Grande, colaborou com o LBDBE e realizou a descontaminação das placas de *Plate Count Agar* (PCA) incubadas com os esporos das bactérias de *B. cereus* através da tecnologia dryVHP (formulação sólida de peróxido de hidrogénio vaporizado).

Posteriormente, realizei um estágio que se dividiu por três locais: na Clínica Veterinária Militar de Equinos, em Mafra, durante o mês de abril; um estágio de igual duração em Clínica de Animais de Companhia, na Clínica Veterinária Militar de Canídeos (3 de maio a 31 de maio), no Prior Velho; por fim, um estágio em Segurança e Defesa Alimentar na Unidade Militar de Medicina Veterinária (1 de junho a 30 de junho), na Graça. Este último compreendeu o desenvolvimento de atividades na área de inspeção sanitária das instalações do Exército Português (ao avaliar o setor de alimentação das respetivas unidades), no âmbito dos seus sistemas de segurança dos alimentos (armazenagem, preparação, confeção, e distribuição de géneros alimentícios). Nesta área acompanhei as visitas de apoio técnico realizadas ao Regimento de Cavalaria nº3 em Estremoz; à Messe de Oficiais de Lisboa, na Graça; ao Regimento de Lanceiros nº2, na Amadora; a várias unidades nos Açores, nomeadamente ao Regimento de Guarnição nº1, na ilha Terceira; ao Regimento de Guarnição nº2, na ilha de São Miguel; na Unidade de Apoio da Zona Militar dos Açores e no Forte de São de Brás, na ilha de São Miguel, e no Destacamento de Santa Maria, na ilha de Santa Maria.

Por fim, ao longo do Estágio de Investigação efetuei a redação da presente dissertação.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Conceitos gerais sobre descontaminação microbiana**

Os microrganismos têm um papel muito importante nas nossas vidas, podendo ser benéfico ou prejudicial consoante o tipo de relação estabelecida entre microrganismo e hospedeiro. As relações deletérias, nomeadamente as de patogenicidade devem ser controladas pois detêm um grande impacto na saúde do ser humano, animais e plantas, com consequências económicas elevadas. Os métodos anti sépticos, desinfetantes e esterilizantes são essenciais para regular este tipo de relação, ajudando a controlar o crescimento e a multiplicação dos microrganismos, diminuindo assim os seus efeitos deletérios, principalmente nos vários ecossistemas onde exista uma estreita relação entre homem – animal – meio ambiente (McDonnell 2017).

Os microrganismos são organismos não observáveis a olho nu e podem ser divididos para fins descritivos nas seguintes tipologias: vírus, bactérias, fungos e protozoários (Willey et al. 2017).

Os vírus são microrganismos acelulares que precisam de invadir o hospedeiro para se multiplicarem. São extremamente pequenos, mas capazes de causar inúmeras doenças em animais e plantas, sendo responsáveis pelo desenvolvimento de grandes epidemias que moldaram a humanidade (ex.: varíola, influenza, gripe aviária, ébola e COVID-19) (Willey et al. 2017). Estruturalmente os vírus podem ser divididos em dois grandes grupos: vírus com envelope e vírus sem envelope. Esta divisão é importante na perspetiva dos processos biocidas, pois permite separar os vírus em duas grandes tipologias de sensibilidade relativamente à ação dos agentes químicos, em vírus sensíveis e resistentes. A resistência está relacionada com a natureza do envelope, que é uma bicamada fosfolipídica, externa à nucleocápside. Os agentes químicos utilizados nos mais diversos biocidas, detêm a capacidade de remover o envelope, desnaturando as proteínas de superfície necessárias para estabelecer o reconhecimento e a adesão celular, levando à inativação do vírus. Os vírus sem envelope, por não possuírem esta estrutura, acabam por ser mais resistentes aos métodos de descontaminação, pois as proteínas de ligação aos recetores celulares estão ligados diretamente a uma estrutura proteica, que confere uma resistência muito maior à desnaturação (McDonnell 2017).

Os fungos são células eucarióticas muito utilizados em processos de fermentação, biodegradação e produção de produtos bioquímicos. Devido à sua ubiquidade, estão geralmente envolvidos em processos de degradação e contaminação de alimentos. Para além disso, são capazes de formar esporos resistentes à descontaminação, que diferem dos esporos bacterianos em termos de estrutura e resistência final aos descontaminantes (McDonnell 2017).

Os protozoários são um grupo que contém uma grande variedade de espécies, sendo unicelulares eucariotas, geralmente móveis, encontrados numa grande variedade de ambientes. São capazes de produzir formas vegetativas como esporozoítos e oocistos. Estes oocistos são capazes de sobreviver por longos períodos de tempo no ambiente e são particularmente resistentes aos métodos de desinfecção química (McDonnell 2017).

As bactérias são organismos unicelulares abundantes em todos os meios: no solo, ar, água, inclusive em locais de condições de vida extremas. Fazem parte da microbiota do ser humano, colonizando-o à nascença e contribuindo para o desenvolvimento do sistema imunitário. Porém, são capazes de causar doenças tornando-se patogénicas sob determinadas situações. Algumas espécies conseguem produzir endósporos, sendo esta uma forma latente e de resistência a condições adversas. Estas formas de resistência são de extrema importância, uma vez que são extremamente difíceis de se eliminar (Figura 1), devido à sua morfologia e propriedades intrínsecas, apresentando desafios à descontaminação microbiana.



**Figura 1: Representação gráfica de alguns microrganismos com resistência descrita a determinados biocidas (original).**

A descontaminação é o termo usado para descrever a destruição ou remoção de agentes microbianos, de forma a tornar o ambiente, objetos e superfícies seguros para uso. Obtém-se, geralmente, pelo emprego combinado de processos de limpeza (remoção da contaminação visível) com processos antimicrobianos, como a desinfecção e esterilização (McDonnell 2017).

A limpeza visa remover sujidade, pó e material orgânico de superfícies, uma vez que a presença destes diminui a eficácia dos desinfetantes e esterilizantes (Kothekar 2020).

Os agentes antimicrobianos podem ser químicos, físicos, mecânicos e biológicos. De forma a simplificar a terminologia, usamos o termo biocida para todos os agentes antimicrobianos usados para o controlo de microrganismos (Willey et al. 2017). Os biocidas definem-se como produtos que controlam a ação de um organismo prejudicial, destruindo, travando o seu crescimento ou tornando-o inofensivo, através mecanismos químicos ou biológicos. São necessários para o controlo de organismos prejudiciais, contudo, devido às suas propriedades intrínsecas e padrões de utilização, podem pôr em risco a saúde humana e animal. De acordo com a diretiva 98/8/EC do Parlamento Europeu, os biocidas devem

respeitar certas características: ser suficientemente eficazes; não ter efeitos nefastos sobre os organismos a que se destinam, nem provocar dor ou sofrimento em vertebrados; não ter intrinsecamente ou pelos seus resíduos, efeitos nefastos na saúde humana e animal (através da água, atmosfera e alimentos), nem nas águas superficiais e subterrâneas; as suas propriedades físicas e químicas terem sido determinadas e consideradas aceitáveis no que respeita a formas adequadas de utilização, armazenamento e transporte do produto. A classificação atual lista os produtos biocidas em 22 tipos, agrupados em 4 grupos principais: desinfetantes, conservantes, produtos para controlo de animais prejudiciais e outros produtos biocidas.

A desinfecção é um processo antimicrobiano de remoção, destruição ou inativação de microrganismos, provocando uma redução do número e tipo de microrganismos viáveis, não os eliminando na totalidade. A desinfecção não elimina esporos bacterianos (McDonnell 2017).

Em contraste, a esterilização provoca a destruição ou remoção da maioria dos microrganismos viáveis, incluindo a maioria dos esporos bacterianos. Desta forma, é utilizada em situações em que é necessária a ausência da maioria de microrganismos, como em salas cirúrgicas de hospitais, salas limpas ou em instrumentos para fins cirúrgicos (McDonnell 2017).

O nível de desinfecção ou esterilização está dependente do uso de cada material: crítico (contacto com tecidos estéreis, tal como os instrumentos cirúrgicos), semicrítico (contacto com membrana mucosa, tal como endoscópios), não crítico (contacto apenas com pele intacta, como por exemplo os estetoscópios). Consoante o emprego dos vários objetos e equipamentos, estes podem requerer esterilização, desinfecção de alto nível e desinfecção de baixo nível, respetivamente (Rutala and Weber 2013). A desinfecção de alto nível elimina todos microrganismos, exceto os esporos bacterianos. No nível intermédio a desinfecção não elimina esporos nem vírus pequenos, sem envelope. O nível mais baixo tem ação contra a maioria dos microrganismos e alguns vírus, exceto esporos e *Mycobacterium tuberculosis* (Tabela 1) (Kothekar 2020).

**Tabela 1: Métodos de desinfecção e esterilização e exemplos de aplicações (Kothekar 2020).**

| <b>Processo</b>                        | <b>Nível de inativação microbiana</b>   | <b>Métodos</b>       | <b>Aplicações</b>  |
|--|---|----------------------|--|
| <b>Esterilização</b>                   | Destruição de todos os microrganismos, incluindo a maioria dos esporos bacterianos                                      | Alta temperatura     | Material crítico, resistentes ao calor                                       |
|  |   | Baixa temperatura    | Material crítico e semicrítico, sensíveis ao calor                           |
|  |   | Imersão em líquido   | Material crítico e semicrítico, sensíveis ao calor e que possam ser imersos. |
| <b>Desinfecção de alto nível</b>       | Destruição de todos os microrganismos, exceto os esporos bacterianos  | Fervura              | Material semicrítico sensível ao calor                                       |
|  |   | Imersão em líquido   |  |
| <b>Desinfecção de nível intermédio</b> | Destruição de bactérias vegetativas, micobactéria e a maioria dos vírus e fungos, não destruindo esporos bacterianos    | Contacto com líquido | Material não crítico e superfícies (sem sangue visível)                      |
| <b>Desinfecção de baixo nível</b>      | Destruição de bactérias vegetativas e a maioria dos vírus e fungos, não destruindo esporos bacterianos nem micobactéria |                      |  |

## **2.2. Necessidades práticas da descontaminação**

A descontaminação é particularmente importante nas unidades de cuidados de saúde, uma vez que ao assegurar que o ambiente se mantém livre de agentes patogénicos evitam-se contaminações cruzadas. Devido à natureza crítica da descontaminação neste ambiente, quer se trate de um hospital, áreas de cirurgia ou outro local de cuidados de saúde, é crucial que as superfícies, o equipamento e todas as áreas sejam frequentemente descontaminados (Creamer and Humphreys 2008). Atualmente, os desinfetantes mais utilizados nestes locais são compostos por álcoois, halogéneos e sais de amónio quaternário (Wawrzyk et al. 2020). O peróxido de hidrogénio parece oferecer capacidade microbicida fiável contra a maioria dos



agentes patogénicos hospitalares, no entanto levanta vários problemas para a saúde pública e provoca erosão das superfícies e utensílios (Dancer 2014).

A indústria alimentar também enfrenta desafios face à descontaminação. Os agentes patogénicos de origem alimentar, principalmente bactérias, fungos e vírus, podem contaminar os alimentos em várias fases da cadeia alimentar, desde a produção até à transformação (Martinović et al. 2016). Estes agentes são responsáveis pela deterioração dos alimentos provocando elevadas perdas económicas no setor alimentar. A deterioração dos alimentos traduz-se em alterações na textura, no odor, bem como na variação do pH e produção de gás (André et al. 2017). Entre os vários microrganismos passíveis de induzir contaminações cruzadas, os esporulados são os que colocam maiores problemas, pois apresentam uma resistência elevada aos tratamentos químicos e aos tratamentos físicos, tradicionalmente utilizados na indústria alimentar. No caso particular dos agentes esporulados, estes podem germinar e desenvolver-se nos produtos alimentares, sempre que encontrem condições adequadas de temperatura, nutrientes e propriedades físico-químicas (André et al. 2017).

Um novo desafio para a saúde pública é o bioterrorismo. O uso de microrganismos patogénicos em atos bioterroristas é um fenómeno que tem vindo a ser objeto de preocupação crescente em diversos países, tendo em conta a possível aplicação de vírus e bactérias para fins terroristas (Schatzmayr et al. 2013). Os agentes patogénicos clássicos referenciados como potenciais agentes de bioterrorismo, são: *Bacillus anthracis* (carbúnculo hemático), *Yersinia pestis* (peste bubónica), *Clostridium botulinum* (botulismo) e a *Francisella tularensis* (tularémia). Relativamente aos vírus, destacam-se os *ortopoxvírus* (ex.: varíola) e as famílias que compreendem os vírus das febres hemorrágicas (Schatzmayr et al. 2013). Durante o período da Guerra Fria, ocorreram programas de desenvolvimento de armas biológicas em vários países, incluindo manipulações genéticas com o objetivo de obter microrganismos mais virulentos e com capacidades de dispersão mais elevadas, como terá sido a combinação do vírus do ébola com o vírus da varíola, aumentando assim a sua resistência e possibilidade de dispersão (Schatzmayr et al. 2013). No início do século XXI, os esporos bacterianos foram utilizados como agente de bioterrorismo (Setlow 2014). Após o ataque terrorista às torres gémeas, em Nova Iorque, ocorreram episódios de envio de cartas contendo esporos de *B. anthracis*, agente etiológico do carbúnculo, resultando na contaminação de escritórios, edifícios e residências em diversos locais da América do Norte. Este atentado resultou em 22 casos suspeitos de terem contraído a doença, 11 casos em que houve infeção respiratória confirmada e 5 óbitos (Schatzmayr et al. 2013), trazendo graves consequências sociais e económicas. É relevante salientar os esforços de biorremediação dos edifícios contaminados, tendo sido investidas avultadas somas de dinheiro (cerca de 320 milhões de dólares americanos) na descontaminação dos edifícios afetados pelos esporos de carbúnculo libertados intencionalmente (Gopinath et al. 2015); (Wood and Adrion 2019).

Desta forma, assiste-se na atualidade a uma necessidade crescente de desenvolver novos métodos de descontaminação, garantindo a integridade dos materiais e equipamentos expostos à ação dos descontaminantes com aplicação em diversos setores da sociedade, nomeadamente nas unidades de saúde, na indústria alimentar, nas forças armadas, nos transportes, entre outros, uma vez que os métodos convencionais são insuficientes para eliminar agentes patogénicos resistentes (Gopinath et al. 2015).

### **2.3. Endósporos bacterianos**

Os esporos bacterianos são formas de resistência produzidos por alguns géneros particulares de procariotas, sendo característicos de dois géneros de Gram positivos: *Bacillus* e *Clostridium*. Estes microrganismos recorrem a um processo designado por esporulação, produzindo uma estrutura de elevada resistência e metabolicamente inerte, designada de endósporo. Os endósporos desenvolvem-se dentro das células vegetativas e caracterizam-se por ser, dentro do mundo microbiológico, as formas biológicas com maior resistência a uma gama diversa de agentes físico-químicos (Cote et al. 2015).

O seu estado de latência pode ser revertido, quando as condições ambientais envolventes se tornam novamente favoráveis (temperatura, humidade e aporte de nutrientes ótimos), iniciando a bactéria um novo ciclo de crescimento e reprodução. A germinação é o processo responsável por reverter o estado de endósporo de volta à forma vegetativa, assim, as bactérias esporuladas apresentam 2 estádios: crescimento vegetativo e resistência, enquanto endósporo (Basta and Annamaraju 2020).

Estas estruturas são extraordinariamente resistentes a processos químicos e físicos, nomeadamente: stress ambiental, tal como o calor, a radiação UV, a radiação  $\gamma$ ; desinfetantes químicos e dessecação, sendo por isso conhecidos por serem a forma mais resistente de vida (Setlow 2014).

Uma problemática relacionada com os organismos esporulados é a capacidade de algumas espécies serem responsáveis por causarem intoxicação alimentar nos humanos, deterioração dos alimentos nas agroindústrias e indústria alimentar, mas também a possibilidade de emprego dos esporos enquanto arma biológica (Setlow 2014).

Alguns exemplos de bactérias formadoras de esporos com interesse em Medicina Veterinária podem ser encontrados na tabela 2.

**Tabela 2: Exemplos de bactérias formadoras de esporos (McDonnell 2017).**

| Agente                                | Doença  | Importância  |
|---------------------------------------|---|--|
| <b><i>Bacillus anthracis</i></b>      | Carbúnculo  | Usado como arma biológica                                    |
| <b><i>Bacillus cereus</i></b>         | Toxinfecção alimentar                             | Toxinfecção alimentar pela ingestão da toxina ou da bactéria |
| <b><i>Clostridium botulinum</i></b>   | Botulismo   | Toxinfecção alimentar pela ingestão da toxina                |
| <b><i>Clostridium tetani</i></b>      | Tétano  | Alimentos caseiros enlatados                                 |
| <b><i>Clostridium perfringens</i></b> | Toxinfecção alimentar<br>Gangrena gasosa (tipo C) | Ingestão de carnes pouco cozinhadas ou cruas                 |

### 2.3.1. Estrutura e propriedades físico-químicas

A resistência dos esporos reside na sua organização estrutural específica, pois as suas camadas de revestimento possuem um papel muito importante na proteção contra a oxidação por agentes descontaminantes (Clair et al. 2020).

A arquitetura destas formas é comum à grande maioria dos esporos, podendo ser dividida em cinco grandes estruturas: o exósporo, o manto, o córtex, a parede celular do esporo, também denominada membrana do esporo e o protoplasto ou núcleo do esporo (Figura 2).

O processo de formação de esporos bacterianos é complexo e moroso, iniciando-se a partir da replicação do ácido desoxirribonucleico (ADN) bacteriano e da formação de dois compartimentos dentro da célula mãe, através do desenvolvimento de um septo assimétrico. A separação completa dos compartimentos celulares origina uma estrutura denominada pré-esporo. Uma vez formado o pré-esporo desencadeia-se uma cadeia de eventos que resultam na deposição e formação do córtex do esporo, localizado entre a membrana interna e externa do pré-esporo, ao qual se segue a deposição do manto e, em algumas espécies, o exósporo (Errington 2003).

O exósporo é a estrutura mais externa, constituída por duas camadas: uma externa denominada camada vilosa e outra interna designada por camada basal. Esta estrutura reveste as restantes camadas e é específica de certas espécies bacterianas (ex: grupo *B. cereus*). Os esporos sem exósporo são denominados de esporos nus (Errington 2003).

As funções da camada vilosa ainda não são totalmente conhecidas. No entanto, aparenta ter funções relacionadas com a virulência, uma vez que esta camada oferece

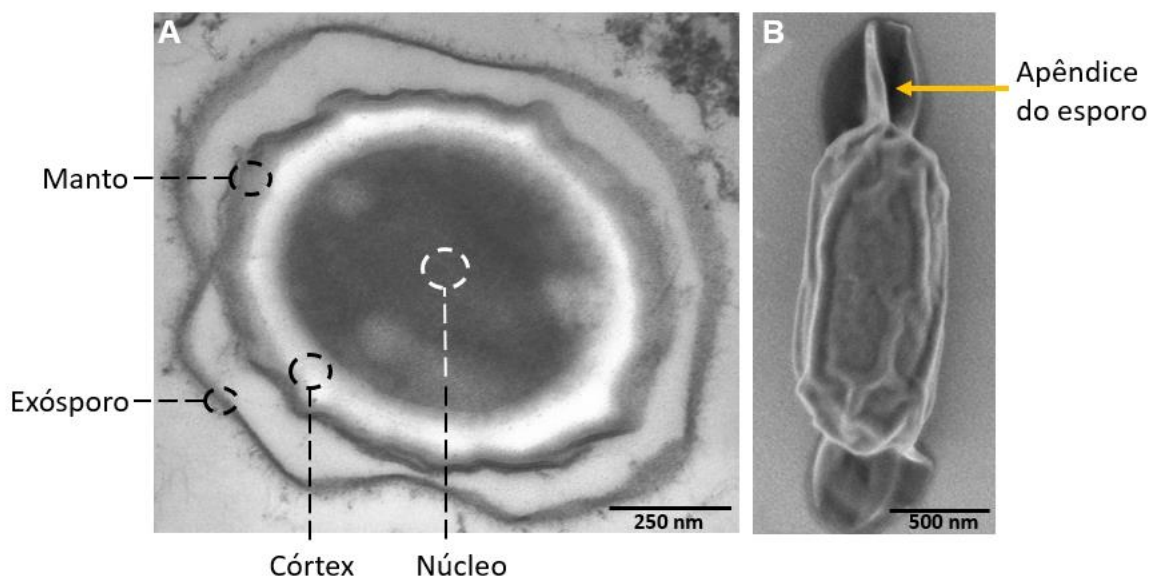
capacidade de ligação a diversas matrizes orgânicas (Ryu et al. 2003). A camada vilosa confere ainda proteção contra a ação de anticorpos e tem também um papel importante na resistência do esporo a diversos agentes físicos e químicos (Plomp et al. 2005). O componente estrutural predominante na formação da camada das projeções vilosas é uma glicoproteína de superfície, denominada BclA (Bressuire-Isoard et al. 2016). Esta glicoproteína tem uma estrutura idêntica à molécula do colagénio produzida pelos fibroblastos.

O manto é a primeira camada nos esporos nus e a segunda, nos esporos com exósporo. É constituído por mais de 40 tipos diferentes de proteínas, dispostas em múltiplas camadas, envolvidas em funções como a proteção e a germinação dos esporos. Encontra-se dividido em duas subcamadas: o manto interno e o manto externo (Basta and Annamaraju 2020). As diversas proteínas que intervêm na formação desta estrutura conferem-lhe várias propriedades, nomeadamente a capacidade de permitir aos esporos resistir a alterações extremas de volume, que poderiam pôr em causa a viabilidade dos esporos. É também de destacar a proteção por parte da superóxido dismutase contra o stress oxidativo, provocado pela ação de radicais do oxigénio, produzidos no sistema imunitário, ou pelo contacto com agentes desinfetantes (Clair et al. 2020). Desta forma, o manto oferece resistência química e enzimática ao esporo.

O córtex dos esporos é composto por peptidoglicano, sendo importante na resistência dos esporos ao calor e responsável por manter o protoplasto, também designado por núcleo do esporo, desidratado, reduzindo assim a atividade da água (aw), conferindo maior resistência contra a ação física do calor e radiações ionizantes (Errington 2003).

O núcleo do endósporo, o protoplasto, encontra-se num estado desidratado, contendo o ADN da célula, ribossomas e grandes quantidades de ácido dipicolínico. Esta substância química específica do endósporo parece desempenhar um papel na manutenção da latência dos esporos. As pequenas proteínas ácido solúveis (SASPs) também só se encontram em endósporos. Estas proteínas ligam e condensam fortemente o ADN e são em parte responsáveis pela resistência à luz UV e aos produtos químicos nocivos ao ADN (Cornell 2021).

Assim que o processo está completo, ocorre a lise da célula mãe e liberta o esporo maduro para o ambiente. Este processo demora 6 a 7 horas, enquanto a formação de uma bactéria vegetativa demora apenas 25 a 30 minutos (Cote et al. 2015).



**Figura 2: Estrutura do esporo da estirpe NCTC 11143 de *B. cereus*. 2A: Microscopia eletrônica de transmissão. 2B: Microscopia eletrônica de varrimento.**

### **2.3.2. *Bacillus cereus* e sua importância**

O *B. cereus* é uma bactéria Gram-positiva, aeróbia facultativa formadora de esporos (Wu et al. 2017). Quando sujeita a condições desfavoráveis à sua sobrevivência, recorre ao mecanismo de esporulação para formar esporos extremamente resistentes às mudanças ambientais e às substâncias químicas tóxicas que destroem os seus componentes celulares (Silva et al. 2013), sendo por isso um agente importante de intoxicação alimentar, devido à capacidade de multiplicação em diferentes tipos de produtos alimentares (Bressuire-Isoard et al. 2016). Os esporos de *B. cereus* encontram-se amplamente distribuídos na natureza, sendo extremamente fácil a ocorrência de contaminações cruzadas oriundas do meio ambiente, ao nível das agroindústrias, indústria alimentar, incluindo o desenvolvimento de processos patogénicos em seres humanos e animais (Silva et al. 2013).

No meio ambiente, o *B. cereus* desenvolve-se em diferentes *habitats*, podendo ainda ser encontrado no intestino de hospedeiros animais e humanos, incluindo em zonas do intestino onde o aporte de oxigénio é limitado (Martinović et al. 2016). A patogenicidade provocada por este microrganismo é principalmente devida à destruição de tecidos na região intestinal. As estirpes patogénicas produzem numerosas enterotoxinas nomeadamente hemolisina BL, enterotoxina não hemolítica e citotoxina K (Gopinath et al. 2015).

A espécie *B. cereus* é um importante agente patogénico alimentar que causa diarreia e intoxicação alimentar, havendo também estirpes capazes de causar feridas localizadas e infeções oculares, bem como doenças sistémicas (Ehling-Schulz et al. 2019).

Este microrganismo tem estado implicado em muitos surtos e é frequentemente isolado de vários tipos de alimentos, nomeadamente de alimentos relacionados com leite cru,

leite pasteurizado e produtos lácteos, arroz, vegetais frescos e alimentos à base de vegetais prontos para consumo (Silva et al. 2013). Cerca de 19.3% de todos os surtos de origem alimentar em 2019 na UE foram causados por toxinas bacterianas produzidas principalmente por *B. cereus*, *C. botulinum*, *C. perfringens* e *Staphylococcus aureus* (European Food Safety Authority, 2021).

#### **2.4. Tipologias de descontaminantes, modos de aplicação e fatores que influenciam a descontaminação**

Os agentes antimicrobianos podem ser classificados consoante a natureza da sua atividade sobre os microrganismos em agentes físicos, químicos e biológicos.

Os métodos físicos incluem o calor e a radiação e ambos os métodos demonstram atividade esporicida contra esporos de espécies de *Bacillus*, nomeadamente o tratamento térmico por calor húmido, a radiação  $\gamma$  e algum tipo de radiação UV (Silva et al. 2013).

A inativação térmica de microrganismos é um procedimento muito utilizado que se aplica tanto à esterilização de alimentos como à descontaminação de objetos inanimados (Buhr et al. 2016). As técnicas de tratamento térmico para a inativação de microrganismos têm sido utilizadas há décadas e podem ser categorizadas como calor húmido ou seco. O calor húmido inclui ambientes com ar a temperaturas elevadas e saturados com humidade, como por exemplo o uso de autoclaves (Wood and Adrion 2019). Os métodos de esterilização por calor seco incluem a utilização de fornos e de incineradores.

A radiação é energia em movimento e refere-se a um processo natural no qual átomos instáveis de um elemento emitem energia em excesso sob a forma de partículas ou ondas eletromagnéticas que se dividem em radiação ionizante e radiação não ionizante. A radiação eletromagnética ionizante inclui os raios X e raios  $\gamma$ , a radiação não ionizante é a energia transmitida sob a forma raios UV (McDonnell 2017).

Os métodos químicos podem ser divididos consoante a aplicação final do descontaminante em líquidos e gasosos. Entre os principais descontaminantes líquidos salienta-se o ácido hipocloroso que é o descontaminante mais utilizado em estudos com esporos de *B. anthracis* (Wood and Adrion 2019). O peróxido de hidrogénio é um poderoso agente oxidante com atividade de largo espetro e possui um bom perfil de segurança (Willey et al. 2017). O ácido peracético tem uma longa história enquanto desinfetante, utilizado na indústria de produção de animais, na indústria alimentar, nos sistemas de saúde humana e na desinfeção de águas residuais (Lemmer et al. 2019). Os álcoois (etanol e isopropanol são os mais utilizados) são bactericidas e fungicidas, mas não são esporicidas (Willey et al. 2017). Os halogénios (flúor, cloro, bromo e iodo) são agentes antimicrobianos, sendo que o iodo costuma ser utilizado em hospitais e o cloro nos sistemas de água e piscinas mas também na indústria alimentar (Willey et al. 2017). No caso dos descontaminantes gasosos são

geralmente utilizados em infraestruturas fechadas (edifícios, veículos, etc.) (Wood and Adrion 2019). O dióxido de cloro gasoso foi utilizado na descontaminação de 4 edifícios (contaminados com esporos de *B. anthracis*) nos Estados-Unidos da América após o ataque bioterrorista de 2001. O brometo de metilo é um descontaminante gasoso utilizado na agricultura e produtos alimentares. O formaldeído gasoso tem sido utilizado como descontaminante há mais de 100 anos pela sua eficácia, baixo custo e compatibilidade com diversos materiais, no entanto é altamente carcinogénico. O ozono gasoso tem vindo a ser utilizado como descontaminante de águas residuais, mas também em diversos equipamentos médicos (Wood and Adrion 2019). Finalmente, a utilização do VHP (peróxido de hidrogénio gasoso vaporizado) como descontaminante é hoje em dia utilizado pelas suas propriedades biocidas e resulta na redução da maioria das estirpes microbianas testadas (Wawrzyk et al. 2020).

#### **2.4.1. Metodologias de aplicação em vigor, aspetos positivos e negativos de cada tipo de metodologia.**

No que diz respeito aos métodos físicos, o tratamento térmico pelo calor húmido é utilizado através de vapor a altas temperaturas (vapor sob pressão). Possui como vantagens a eficiente esterilização de certos líquidos, alimentos e alguns materiais sólidos, é uma metodologia segura com resultados amplamente conhecidos sobre vários microrganismos. No entanto, a utilização de calor húmido não é adequada para esterilizar materiais sensíveis ao calor ou a pressões elevadas e cada ciclo de esterilização demora muito tempo (McDonnell 2017). O calor seco é outra abordagem empregue dentro dos métodos térmicos e costuma ser utilizado na eliminação de resíduos médicos, veterinários e industriais contaminados. A incineração possui a vantagem de reduzir consideravelmente (até 90%) o volume dos materiais descartados, é uma metodologia de fácil aplicação com eficácia antimicrobiana de largo espectro de ação. No entanto, possui incompatibilidade com diversos materiais termossensíveis e pode produzir produtos tóxicos (dioxinas e monóxido de cloro) após a incineração (McDonnell 2017).

Quanto aos métodos que utilizam a radiação, nomeadamente a ionizante, destacam-se os raios  $\gamma$  e os raios x, apresentando estes últimos menos energia e capacidade de penetração do que os primeiros. Estas radiações ionizantes são utilizadas em processos de desinfecção e esterilização de alimentos, água e alguns dispositivos médicos (*pacemakers*) e produtos de cosmética. Possuem elevada fiabilidade com tempos de exposição curtos. No entanto as desvantagens são o elevado custo, a segurança e proteção dos operadores e a incompatibilidade com certos materiais (McDonnell 2017). A radiação não ionizante, nomeadamente a UV tem sido utilizada para a desinfecção de implantes de titânio e lentes de contacto, mas também para a descontaminação de câmaras de isolamento e de fluxo laminar (McDonnell 2017). Como desvantagens, os raios UV podem danificar o tecido cutâneo e os

olhos quando expostos diretamente à radiação, possuem incompatibilidade com algumas superfícies e a eficácia desta metodologia é muito reduzida na presença de matéria orgânica (McDonnell 2017).

No caso dos métodos químicos, as metodologias utilizadas para a aplicação de descontaminantes podem ser divididas em descontaminação líquida e gasosa, sendo que a primeira se caracteriza por ser mais simples do que a descontaminação gasosa (Wood and Adrion 2019). Os descontaminantes líquidos podem ser aplicados através de várias metodologias diferentes. Estes métodos incluem a pulverização/aspersão (*spraying*) (geralmente preferível a baixa pressão para minimizar a aerossolização dos esporos), a imersão (útil para materiais a serem descartados como resíduos), a nebulização (*fogging*) (consiste na deposição de microgotículas, útil para descontaminar superfícies volumétricas), a utilização de géis e espumas (úteis para superfícies verticais ou tetos de edifícios), ou simplesmente utilizando matrizes húmidas tipo panos ou esponjas (Wood and Adrion 2019). A diferença entre atomização e nebulização está no tamanho da partícula. A nebulização forma microgotículas que variam entre 1 e 5 micron, valores acima de 5 micron podem ser considerados metodologias de atomização. O peróxido de hidrogénio gasoso pode ser utilizado, sob a forma de vapor por atomização, como HPV (vapor de peróxido de hidrogénio), mas também pode ser aplicado por vaporização, sob a forma de VHP (peróxido de hidrogénio vaporizado) (Wawrzyk et al. 2020). Na aplicação de descontaminantes líquidos sob a forma de atomização ou nebulização (HPV) existe a formação de microgotículas de líquido descontaminante, que vão ser dispersas pela atmosfera. Esta técnica HPV utiliza o fenómeno da microcondensação, pelo que pode reagir mais intensamente com as superfícies a descontaminar (e em menor grau com os microrganismos).

Os descontaminantes gasosos são geralmente utilizados em espaços interiores como viaturas e edifícios, por exemplo (Wawrzyk et al. 2020). Estes possuem a vantagem de inativar esporos aerossolizados e podem ser amplamente dispersos, penetrando mais profundamente em certas superfícies de difícil acesso através de fendas, por exemplo (Wood and Adrion 2019).

O VHP é um dos descontaminantes gasosos mais utilizados nos dias de hoje e as aplicações do VHP incluem a esterilização de materiais e equipamentos médicos como por exemplo câmaras de isolamento, microscópios, estufas, entre outros equipamentos sensíveis (McDonnell 2017). Durante o processo de descontaminação, o VHP decompõe-se em água e oxigénio, sendo ambos inofensivos. O VHP pode ser utilizado com uma vasta gama de temperaturas (4 a 80°C) e não danifica a maioria dos materiais. No entanto as desvantagens relacionam-se com perigos de saúde dos operadores e no facto que o VHP não poder ser utilizado para descontaminar líquidos (McDonnell 2017). Os dispositivos de descontaminação por VHP são caros e requerem operadores treinados, um ciclo completo de descontaminação



pode demorar várias horas (Dancer 2014). Relativamente à aplicação por vaporização (VHP), existe a formação de moléculas individuais da substância descontaminante (Wawrzyk et al. 2020). Pelo contrário, a microcondensação do descontaminante ocorre em menor grau com o sistema VHP (devido à desumidificação do ar). Sendo assim, o sistema VHP interage principalmente com os microrganismos (e em menor intensidade com a superfície descontaminada) (Wawrzyk et al. 2020). Por outro lado, a distribuição por VHP é muito mais uniforme do que a distribuição de microgotículas (HPV), pois estas tendem a depositar-se sob a ação da gravidade. A substância descontaminante é absorvida em muito menores quantidades pelos materiais quando dispersa por VHP, comparativamente às microgotículas, logo a compatibilidade dos materiais é muito superior quando expostos à tecnologia VHP (Delox 2021). Por fim, o tempo de arejamento, isto é, a remoção do biodescontaminante, é muito superior no caso deste se encontrar na forma de microgotículas, o que é desvantajoso se houver necessidades de utilização rápida do ambiente descontaminado. Em função de todas estas características, é de realçar que a aplicação de descontaminantes por vaporização é uma tecnologia mais eficiente relativamente à atomização/nebulização (Delox 2021).

#### **2.4.2. Fatores que influenciam a descontaminação**

Os processos práticos de descontaminação em ambiente real são afetados por vários fatores sendo importante entrar em linha de conta com o meio ambiente e com a metodologia de aplicação dos descontaminantes (Richter et al. 2018). Os fatores que influenciam a eficiência da descontaminação são diversos e entre os mais importantes a destacar temos: o pH, a humidade relativa, a temperatura, o tempo de exposição, a concentração dos reagentes, as características da superfície contaminada (por exemplo a rugosidade e porosidade) e o grau de limpeza da superfície (Robertson et al. 2018). A carga e a tipologia da população microbiana (ex.: biofilmes, simples, complexos, esporos, etc.) influencia a descontaminação, sendo necessário maior tempo de exposição nas populações mais concentradas. A composição da população é outro fator importante porque os microrganismos diferem muito entre si e influenciam a eficácia dos descontaminantes (Willey et al. 2017). Por exemplo, os esporos bacterianos são muito resistentes aos descontaminantes mesmo em condições ambientais extremas (Gopinath et al. 2015), requerendo concentrações mais elevadas de descontaminantes. Quanto maior for o tempo de contacto de uma população exposta a determinado descontaminante, melhor será a eficácia da descontaminação. Relativamente à concentração do descontaminante, maior concentração nem sempre equivale a melhor eficácia, por exemplo o etanol líquido a 70% é mais bactericida do que o etanol a 95% (Willey et al. 2017). Por fim, a matéria orgânica é um fator ambiental importante que influencia a

descontaminação, conferindo proteção aos microrganismos contra os vários agentes físicos e químicos (Willey et al. 2017).

#### **2.4.3. Limitações e condicionantes identificados nas metodologias químicas em vigor relativamente à descontaminação**

Comparando tecnologias de descontaminação gasosas e líquidas é possível salientar que os descontaminantes gasosos são mais suscetíveis de ser afetados por variações de temperatura e humidade (Choi et al. 2020 Jun 19). Uma limitação dos descontaminantes líquidos é serem utilizados principalmente para a descontaminação de superfícies e não contra agentes aerossolizados (Wood and Adrion 2019).

O VHP é produzido a partir de uma solução de peróxido de hidrogénio em água que é passada sobre um vaporizador para atingir uma concentração de vapor entre 140ppm e 1400ppm, em função do microrganismo a descontaminar. O VHP e os seus subprodutos são tóxicos (75 ppm são perigosos para a saúde humana) e matam uma grande variedade de microrganismos (Willey et al. 2017). A eficácia do VHP é inferior quando utilizado para descontaminar materiais porosos como por exemplo a madeira, betão e alcatifa em comparação com materiais não porosos como o vidro e o metal (Wood and Adrion 2019).

Os vaporizadores comerciais atuais (por exemplo, os fabricados pela *Bioquell* e *Steris*) utilizam a tecnologia de vaporização *flashpoint*, um processo complexo no qual o peróxido de hidrogénio líquido a vaporizar é atomizado num primeiro passo e depositado numa placa quente (> 100°C) que provoca uma vaporização instantânea das microgotículas do peróxido de hidrogénio, passando este para a forma gasosa (McDonnell 2017). A vaporização *flashpoint* utilizada pela *Steris* mantém uma baixa humidade relativa (menos de 40% no início do processo) para tentar manter o peróxido na forma gasosa. Por outro lado, o processo de *flashpoint* VHP utilizado pela *Bioquell* permite valores de humidade relativa superiores, provocando a microcondensação do peróxido de hidrogénio na superfície a descontaminar (Khardori 2006). Esta metodologia de vaporização *flashpoint* é um procedimento dispendioso que exige máquinas complexas e pesadas, as quais apresentam uma portabilidade muito reduzida (McDonnell 2017).

A tecnologia dryVHP desenvolvida pela Delox simplifica a vaporização de oxidantes. Esta tecnologia consiste numa formulação sólida de nanopartículas que contém o peróxido de hidrogénio, permitindo a sua vaporização através de um simples aquecimento (60°C). Deste modo, os vaporizadores que usam a tecnologia dryVHP são previsivelmente máquinas simples, robustas, com elevada portabilidade, podendo ser sujeitos a choques e vibrações sendo ideais para uma utilização operacional pelo Exército (Delox 2021).

No caso do peróxido de hidrogénio aplicado por dryVHP (Delox) nas experiências efetuadas no presente estudo, o descontaminante é adsorvido na forma gasosa depois de ser

gaseificado (aquecido) e é adsorvido em nanopartículas (de sílica). Sendo assim, a tecnologia dryVHP é menos dispendiosa do que a tecnologia *flashpoint* (utilizada pela *Steris* e *Bioquell*) para vaporizar o peróxido de hidrogénio líquido. No entanto, ambas as tecnologias sofrem do fenómeno de microcondensação (descontaminante passa do estado gasoso para o estado líquido em superfícies, sob forma de microgotículas) (Delox 2021).

Sendo assim, é possível concluir que a nebulização com o peróxido de hidrogénio ou atomização do peróxido de hidrogénio é uma alternativa mais barata, mas menos eficiente do que a tecnologia VHP, na qual as gotículas de peróxido de hidrogénio são emitidas para a atmosfera. Estas microgotículas tendem a agregar-se (coalescência), aumentando a dimensão das partículas, o que provoca a sua deposição nas superfícies e leva à diminuição da concentração de peróxido de hidrogénio na atmosfera, reduzindo muito a eficácia da descontaminação. Além disso, o elevado teor de água nas microgotículas faz com que a nebulização seja incompatível com materiais e equipamentos eletrónico (Delox 2021).

## **2.5. Enquadramento da dissertação no projeto DRACO**

Entre 2008 e 2019, o Laboratório de Bromatologia e Defesa Biológica do Exército (LBDBE), em consórcio com o Centro de Investigação da Academia Militar (CINAMIL), participou em vários projetos (BIODECON, REUSE, etc.) de descontaminação, que tinham como objetivos o estudo e a testagem dos principais descontaminantes existentes no Exército Português. Foram testadas várias substâncias ativas, como o ácido peracético e o peróxido de hidrogénio, contra esporos de agentes biológicos do grupo *B. cereus*. Na sequência destes projetos, verificou-se a necessidade de desenvolver novas formulações de descontaminantes que sejam mais eficientes, menos tóxicas para o ambiente, mais simples de aplicar e, se possível, recorrendo à exposição mínima dos operadores à contaminação biológica.

Neste âmbito, em janeiro de 2019, inicia-se o projeto “Descontaminação por Aerossol Gasoso de Partículas Oxidantes” (DRACO), que pretende continuar a linha estratégica da descontaminação, no apoio à componente operacional do Exército. A presente dissertação tem por base a participação no projeto DRACO durante um período de 6 meses, durante o qual se realizaram várias experiências focadas na descontaminação de esporos de *B. cereus*, da estirpe NCTC 11143, em superfícies limpas e superfícies sujas com óleo alimentar. As experiências de descontaminação foram efetuadas nos esporos de *B. cereus*, como substituto para os esporos de *Bacillus anthracis*, uma vez que partilham características físicas e genéticas.

A tecnologia descontaminante em teste, designada por dryVHP, foi desenvolvida pela Delox, uma *startup* inovadora da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, que tem como objetivo permitir a criação de uma nova geração de sistemas de descontaminação.

Os descontaminantes utilizados foram o peróxido de hidrogénio líquido numa concentração de 10%, o ácido peracético líquido numa concentração de 0.1% e o peróxido de hidrogénio gasoso desenvolvido pela Delox. O projeto DRACO, pretende testar a eficácia de um novo descontaminante desenvolvido pela Delox, baseado em nanopartículas oxidantes. A tecnologia dryVHP foi desenvolvida na Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa pela equipa da Delox.

### **3. OBJETIVOS**

O projeto DRACO tem como objetivo continuar a linha estratégica da descontaminação, no apoio à componente operacional da Companhia de Defesa NBQR, do Regimento de Engenharia Nº1 de Tancos.

Os objetivos específicos do presente trabalho de investigação inserem-se nos do projeto DRACO. Sendo assim, este estudo focou-se na avaliação da eficácia de um novo descontaminante desenvolvido pela Delox (dryVHP), baseado em nanopartículas oxidantes.

No presente estudo, foram salientados os seguintes objetivos principais:

- Determinar a eficácia da tecnologia descontaminante dryVHP, desenvolvida pela Delox, aplicada na forma gasosa, em superfícies limpas contaminadas com esporos de *B. cereus*.
- Determinar a eficácia da tecnologia descontaminante dryVHP, desenvolvida pela Delox, aplicada na forma gasosa, em superfícies sujas com matéria orgânica (óleo alimentar), contaminadas com esporos de *B. cereus*.
- Comparar os resultados da descontaminação gasosa com os resultados da descontaminação líquida para aferir a capacidade esporicida destes tipos de descontaminantes.

### **4. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **4.1. Documentos normativos e metodologia de testagem de descontaminantes**

O protocolo experimental realizado baseou-se nas normas internacionais EN 13704 *Chemical disinfectants - Quantitative suspension test for the evaluation of sporicidal activity of chemical disinfectants used in food, industrial, domestic and institutional areas - Test method and requirements (phase 2, step 1)* e EN 14347 *Chemical disinfectants and antiseptics - Basic sporicidal activity- Test method and requirements (phase 1, step 1)*.

O procedimento experimental incluiu duas fases: 1) Fase líquida, onde foi testada a capacidade esporicida de descontaminantes líquidos (peróxido de hidrogénio líquido a 10% e

ácido peracético a 0.1%) sobre superfícies limpas e superfícies sujas (indutor de sujidade - óleo alimentar), contaminadas com esporos de *B. cereus*. Foram inoculados  $5.90 \times 10^8$  ufc/mL de esporos da subpopulação do topo e  $5.63 \times 10^9$  ufc/mL de esporos da subpopulação do fundo. 2) Fase gasosa, onde foi avaliada a eficácia esporicida de uma nova tecnologia descontaminante baseada em nanopartículas oxidantes. A tecnologia em teste designa-se dryVHP e foi desenvolvida na Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa pela equipa da Delox. DryVHP foi aplicada por aerossolização sobre superfícies limpas e superfícies sujas contaminadas com uma solução de esporos de *B. cereus* ( $5.90 \times 10^8$  ufc/mL de esporos da subpopulação do topo e  $5.63 \times 10^9$  ufc/mL de esporos da subpopulação do fundo), à semelhança da primeira fase.

Considera-se uma redução log de 99.99% como critério de eficácia mínimo para que o descontaminante em teste possua ação esporicida.

#### **4.2. Estirpe utilizada e crescimento bacteriano**

A estirpe utilizada nos estudos de descontaminação foi a NCTC 11143, pertencente à coleção de bactérias do grupo *B. cereus* do LDBE. O crescimento bacteriano foi realizado em placas de Petri de plástico (Normax, Marinha Grande, Portugal) com o meio de cultura *Plate Count Agar* (PCA) (VWR® BDH Chemicals, Radnor, EUA) incubadas a 30°C durante 24h de acordo com a ISO 21871:2006.

#### **4.3. Meios de cultura**

Para a germinação e crescimento dos esporos de *B. cereus* foram utilizadas placas de Petri (Normax) com o meio de cultura PCA (VWR® BDH Chemicals). O meio foi preparado segundo as indicações do fabricante dissolvendo-se 23.5 g de pó em 1 litro de água destilada estéril (ADE). A solução foi homogeneizada num balão volumétrico de 1 litro e aquecida até entrar em ebulição. A esterilização do PCA (VWR® BDH Chemicals) foi realizada em autoclave durante 15 minutos a 121°C e o meio foi dispensado em placas de Petri de plástico (Normax) e deixou-se solidificar à temperatura ambiente.

#### **4.4. Tampão fosfato salino**

O tampão fosfato salino (*Phosphate-buffered saline* - PBS) (VWR® PanReac AppliChem, Radnor, EUA) foi preparado dissolvendo-se 8 g de NaCl, 0.2 g de KCl, 1.44 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.24 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  em ADE num balão volumétrico de 1 litro. O tampão foi homogeneizado e aquecido até à ebulição. Posteriormente, foi esterilizado em autoclave durante 15 minutos a 121°C e armazenado em refrigeração.

#### **4.5. Tampão de TritonX 0.5% em fosfato salino**

A preparação do tampão de TritonX 0.5% (VWR® Life science, Radnor, EUA) em fosfato salino (PBS com TritonX 0.5% - PBST 0.5%) foi realizada adicionando-se 5 mL de TritonX

(VWR® Life science) a 100% a 995 mL de PBS (VWR® PanReac AppliChem). O tampão foi homogeneizado e aquecido até à ebulição. Posteriormente, foi esterilizado em autoclave durante 15 minutos a 121°C e armazenado em refrigeração.

#### **4.6. Solução de diluição de TritonX 0.1% em meio de infusão coração-cérebro**

O meio de infusão coração-cérebro (BHI) (VWR® BDH Chemicals, Radnor, EUA) foi preparado dissolvendo-se 37 g de pó num litro de ADE. A solução foi homogeneizada e aquecida até à ebulição. Posteriormente, foi esterilizada em autoclave durante 15 minutos a 121°C e armazenada em refrigeração.

Preparou-se uma solução diluidora de BHI (VWR® BDH Chemicals) com TritonX a 0.1% (BHIT 0.1%) (VWR® Life science). Adicionou-se 1 mL de TritonX a 100% (VWR® Life science) a 999 mL de BHI (VWR® BDH Chemicals), obtendo-se 1 litro de BHIT 0.1%. Posteriormente, esterilizou-se a solução em autoclave durante 15 minutos a 121°C e armazenou-se em refrigeração.

#### **4.7. Preparação e quantificação de suspensões de esporos de *B. cereus***

Os esporos da estirpe de *B. cereus* NCTC 11143 foram produzidos em meio de esporulação sólido, BBL™ AK agar#2 (agar de esporulação), da BD Biosciences, em placas de Petri de plástico (Normax), ventiladas, de Ø90 mm. As placas de Petri de BBL™ AK agar#2 foram inoculadas com 0.1 mL de um pré-inóculo de *B. cereus* NCTC 11143, com 18 horas de crescimento em meio líquido de BHI (VWR® BDH Chemicals). O volume inoculado foi semeado por espalhamento utilizando um espalhador em L (VWR® international, Radnor, EUA) e as placas de Petri (Normax) incubadas a 30 °C durante 7 dias, numa estufa de incubação (Mettler, Büchenbach, Alemanha). No final dos 7 dias os esporos foram colhidos por raspagem para um tubo falcon de 50 mL (Corning®, Glendale, EUA) com 30 mL de ADE e submetidos a um choque térmico de 72 °C durante 15 min. Em seguida o tubo foi agitado a 10.000 rotações por minuto (rpm) num vortex genie2 (Scientific industries Inc., Nova Iorque, USA), com o acessório de agitação turbo mixer (Scientific industries Inc., Nova Iorque, USA), durante 10 minutos e deixados a sedimentar em refrigeração durante um período de 18 horas. O sobrenadante foi descartado e adicionada novamente ADE. O processo foi repetido sequencialmente mais 2 vezes e após a última lavagem os esporos foram analisados por microscopia ótica de contraste de fase (Olympus BX51, Japão), para avaliar o grau de pureza e a integridade dos esporos.

#### **4.8. Separação das subpopulações de esporos de *B. cereus***

O fracionamento da população de esporos foi realizado a partir de esporos puros, suspensos em 20 mL de ADE num tubo falcon de 50 mL (Corning®) e homogeneizados por vortex genie2 (Scientific industries Inc.) a 2000 rpm durante 1 minuto. A suspensão

homogeneizada foi centrifugada a 4600 g durante 15 min a 4 °C (Rotanta 460R, Hettich), e as frações de esporos colhidas para dois novos tubos falcon de 50 mL (Corning®) com 20 mL de tampão TritonX 0.5% (VWR® Life science) em PBS (VWR® PanReac AppliChem). O fracionamento originou duas frações, a primeira localizada no sobrenadante (esporos do topo) e colhida utilizando uma espátula estéril e a segunda, localizada no fundo do tubo (esporos do fundo), obtida após remoção do sobrenadante, por pipetagem.

#### 4.9. Preparação das matrizes para descontaminação

Foram preparados dois tipos de matrizes para este estudo, as matrizes limpas e as matrizes sujas. As matrizes utilizadas foram tubos de plástico falcons de 50 mL (Corning®). Cada falcon (Corning®) foi identificado em função do tipo de descontaminante a aplicar e da fração de esporos a pipetar.

Na preparação das matrizes limpas, foram pipetados 100 µL de uma suspensão de esporos de *B. cereus* de concentração conhecida ( $5.90 \times 10^8$  ufc/mL de esporos do topo e  $5.63 \times 10^9$  ufc/mL de esporos do fundo). Retirou-se a tampa dos tubos (Corning®) e colocou-se papel de filtro (VWR® international, Radnor, EUA) no lugar desta. Posteriormente, os tubos (Corning®) foram colocados numa estufa de incubação (Mettler) a 55 °C durante 2 horas.

A preparação das matrizes sujas foi realizada pipetando-se 30 µL de óleo alimentar (óleo de girassol, Fula, Lisboa, Portugal) aplicados por cima dos esporos secos, garantindo um recobrimento homogéneo do óleo alimentar sobre a totalidade dos esporos. Após este passo, colocaram-se os tubos (Corning®) na estufa (Mettler) a 55°C durante 30 minutos, para garantir uma infiltração homogénea do óleo na massa de esporos.

#### 4.10. Quantificação dos esporos de *B. cereus*

A quantificação dos esporos de *B. cereus* foi realizada segundo o método das diluições seriadas de base 10, em placas de PCA (VWR® BDH Chemicals). As diluições foram efetuadas em tubos de 1.5 mL (VWR® international, Radnor, EUA) utilizando como diluidor a solução de TritonX 0.1% (VWR® Life science) em BHI (VWR® BDH Chemicals). O volume inoculado em cada placa de PCA (VWR® BDH Chemicals) foi de 0.1 mL e o espalhamento foi realizado utilizando um espalhador de plástico em L (VWR® international). As placas semeadas foram incubadas a 30 °C durante 24 horas, sendo determinado o título de esporos em unidades formadoras de colónias (ufc) por mililitro, após a contagem do número de colónias originadas na superfície do agar (critério de contagem  $15 \geq \text{ufc} \leq 150$ ). O cálculo para determinar o título final das suspensões de esporos purificadas foi realizado segundo a fórmula:

$$\frac{\text{ufc}}{\text{mL}} = \text{número de colónias por placa} \times \frac{1}{\text{volume de esporos inoculados}} \times \text{fator de diluição}$$

#### **4.11. Preparação do inibidor da descontaminação**

O inibidor da descontaminação (tiosulfato de sódio  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) (Honeywell Fluka™, Charlotte, EUA) foi preparado dissolvendo-se 62.79 g de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  penta hidratado em 990 mL de PBS (VWR® PanReac AppliChem) e adicionou-se 10 mL de TritonX a 100% (VWR® Life science), obtendo uma solução com uma concentração de 40 g/L de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  (Honeywell Fluka™) e TritonX a 1% (VWR® Life science). A solução foi homogeneizada e aquecida até à ebulição. Posteriormente, a solução foi esterilizada em autoclave durante 15 minutos a 121°C e armazenada em refrigeração.

#### **4.12. Ácido peracético a 0.1%**

O ácido peracético a 0.1% (Merck VWR®, Radnor, EUA) foi preparado diariamente por diluição em ADE, a partir de uma solução concentrada a 39% e conservada a -18 °C. A solução de ácido peracético a 0.1% (Merck VWR®) é utilizada como controlo padrão, sendo conservada em refrigeração e em frascos de vidro, por um período máximo de 24 horas.

#### **4.13. Peróxido de hidrogénio líquido a 10%**

O peróxido de hidrogénio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) líquido a 10% preparou-se a partir da diluição do  $\text{H}_2\text{O}_2$  líquido a 30% (Acros Organics, Waltham, EUA) em ADE. A solução de peróxido de hidrogénio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) líquido a 10% (Acros Organics) foi conservada à temperatura ambiente em frascos de vidro.

#### **4.14. Peróxido de hidrogénio gasoso**

O peróxido de hidrogénio na forma gasosa foi preparado e gentilmente fornecido pela companhia Delox, para utilização nos seus equipamentos de descontaminação, que utilizam a tecnologia dryVHP. A preparação e a formulação deste descontaminante está protegida por patente, não podendo ser descrita a sua técnica de preparação.

#### **4.15. Descontaminação por dryVHP**

A descontaminação dos esporos de *B. cereus* estirpe NCTC 11143 por dryVHP foi efetuada nas instalações da Delox. O procedimento foi realizado no interior duma câmara de isolamento (Getinge LaCalhene, Vendôme, França) para evitar o risco de exposição do operador ao vapor de peróxido de hidrogénio. Os tubos de falcon de 50 mL (Corning®) com as frações de esporos de *B. cereus* foram colocados no interior da câmara (Getinge LaCalhene) e removidas as tampas por completo para garantir a total exposição ao descontaminante. O processo de descontaminação teve uma duração de 30 minutos, utilizando 16 g de dryVHP aquecidos a 60°C no interior do módulo de aquecimento (Figura 7B no subcapítulo dos resultados 5.3). A concentração final de peróxido de hidrogénio atingida foi de 1034 ppm, para uma temperatura de 39°C. Os tubos falcon de 50 mL (Corning®) foram retirados da câmara (Getinge LaCalhene) e pipetou-se 10 mL de PBS (VWR® PanReac



AppliChem) e 10 mL da solução de inibidor da descontaminação em cada tubo, para parar a reação oxidativa.

#### **4.16. Recuperação dos esporos de *B. cereus* após descontaminação**

Os esporos de *B. cereus* NCTC 11143 foram recuperados aplicando-se 20 mL da solução de inibidor (20g/L) em todos os tubos falcon de 50 mL (Corning®) descontaminados na fase líquida e na fase gasosa. Posteriormente, os tubos foram selados colocando-se parafilme (Heathrow Scientific, Vernon Hills, EUA) e *ChemTape* (Kappler®, Guntersville, EUA) para evitar a abertura das tampas. Após este passo, todos os tubos foram agitados a 10.000 rpm num vortex genie2 (Scientific industries Inc.), com o acessório de agitação turbo mixer (Scientific industries Inc.) durante 15 minutos. Após agitação, os tubos foram colocados em banho-maria a 20°C durante 20 minutos (Grant LSB Aqua Pro, Pocklington, Reino-Unido).

Posteriormente, procedeu-se à concentração dos esporos por centrifugação dos tubos a 4600 g durante 15 min a 4 °C (Rotanta 460R, Hettich). Após este passo, retirou-se 19 mL de sobrenadante com uma pipeta de 10 mL (VWR® Collection, Radnor, EUA) e de seguida retiraram-se mais 900 µL de sobrenadante com uma micropipeta de 1000 µL (Eppendorf®, Hamburgo, Alemanha). O volume final foi ajustado até perfazer 100 µL. Os tubos falcon (Corning®) com esporos de *B. cereus* concentrados no fundo foram armazenados em refrigeração a 4 °C e quantificados segundo o descrito no ponto 4.10.

#### **4.17. Microscopia ótica de contraste de fase**

As amostras para microscopia de contraste de fase foram montadas entre lâmina (VWR® international, Radnor, EUA, 2.6cm x 5cm) e lamela (VWR® international, Radnor, EUA, 2cm x 2cm) e para cada amostra foram depositados 10 µL de suspensão de esporos sobre uma lâmina (VWR® international). A amostra foi depois coberta com uma lamela (VWR® international) e observada após 10 minutos de repouso, num microscópio de contraste de fase (Olympus BX51, Tóquio, Japão) com uma objetiva de 100 aumentos e uma ocular de 10 aumentos.

#### **4.18. Microscopia eletrónica de varrimento**

Os esporos para microscopia eletrónica foram fixados em glutaraldeído (2.5%), mais formaldeído (1%) em tampão fosfato (0.2M) durante 15 min. Os esporos fixados foram lavados duas vezes em PBST e sedimentados em microtubos de 2 mL usando uma centrífuga (Rotanta 460R, Hettich, Tuttlingen, Alemanha), a 6000g / 5 min. Os esporos foram contrastados com tetróxido de ósmio 1% em água durante 15 min, lavados duas vezes em PBST e precipitados em microtubos de 2 mL usando uma centrífuga (Rotanta 460R, Hettich), a 6000g / 5 min. Após contrastar, os esporos foram desidratados aplicando gradientes sequenciais de etanol, de 50% a 100% em aumentos de 10%. O etanol foi substituído por

acetona absoluta e 20 µL de esporos foram aplicados numa lamela de vidro (VWR® international). Uma gota de 50 µL de HDMS foi aplicada sobre os esporos e deixada secar em uma hote química. Os esporos foram recobertos com uma camada de ouro de 10 nm, num nebulizador eletrónico de metais (cressington 108 golden sputter). As amostras foram observadas num microscópio eletrónico de varrimento a 15 kV (TM3030 plus, Hitachi SEM).

#### **4.19. Análise estatística**

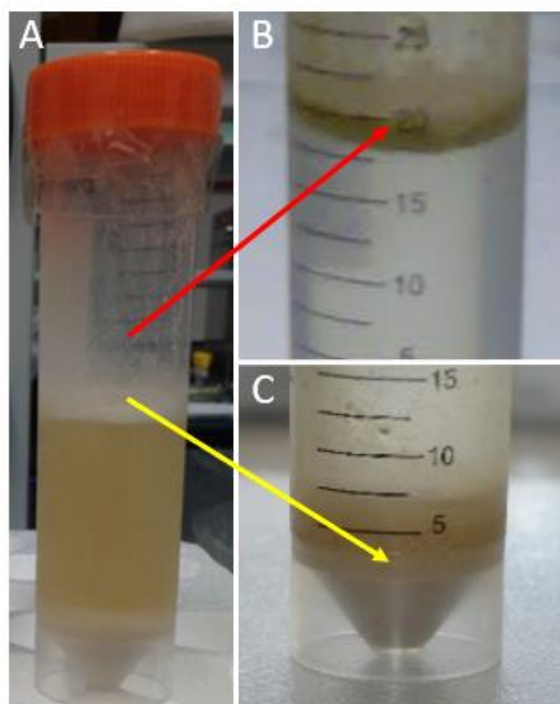
A análise estatística foi efetuada utilizando o programa estatístico *GraphPad Prism* 8.0.2 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia). Os resultados da descontaminação, obtidos a partir das contagens em placa de Petri (Normax) foram analisados empregando o teste não paramétrico de *Mann-Whitney*.

### **5. RESULTADOS**

Os resultados apresentados neste trabalho surgem no âmbito de um projeto de investigação aplicada, que visa testar a eficácia de um novo descontaminante baseado em nanopartículas oxidantes e compará-la com os descontaminantes vulgarmente empregues na descontaminação de microrganismos patogénicos. No presente trabalho utilizámos como descontaminantes padrão o peróxido de hidrogénio líquido, numa concentração de 10%, e o ácido peracético líquido numa concentração de 0.1%. O agente biológico selecionado para a realização dos testes de eficácia a descontaminantes foram os esporos da estirpe NCTC 11143 de *B. cereus*. A escolha das formas esporuladas de *B. cereus* reside na elevada resistência destas estruturas, contra diversos tipos de agentes físicos e químicos. Assim, os esporos são bons indicadores na testagem da atividade bactericida e esporicida de substâncias químicas.

A estirpe de *B. cereus* NCTC 11143 apresenta duas frações de esporos após purificação em ADE.

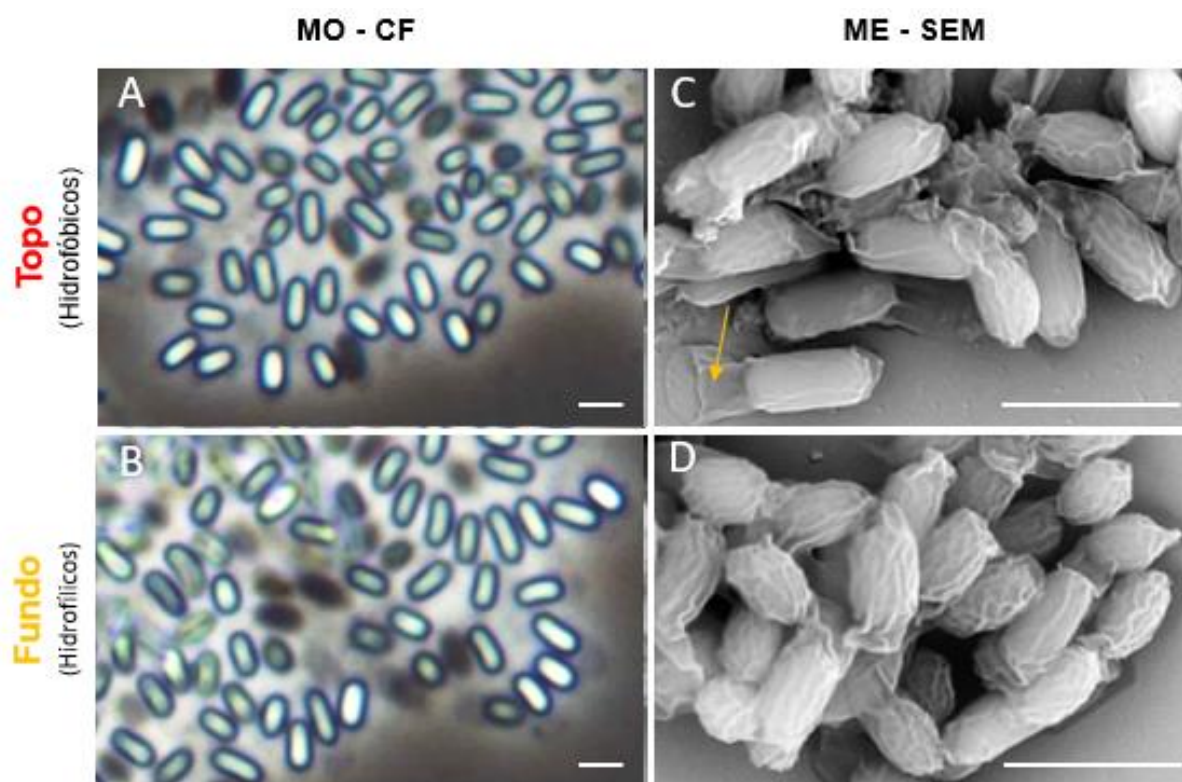
A origem dos esporos de *B. cereus* NCTC 11143 provém da purificação dos esporos a partir de 10 placas do meio BBL™ AK agar#2, consoante os procedimentos efetuados no subcapítulo 4.8.



**Figura 3: Purificação das subpopulações dos esporos de *B. cereus* estirpe NCTC 11143. 3A: População total de esporos em ADE. 3B: Fração de esporos do topo (esporos hidrofóbicos) após purificação em ADE. 3C: Fração de esporos do fundo (esporos hidrofílicos) após purificação em ADE.**

Após o processo de purificação dos esporos de *B. cereus* estirpe NCTC 11143 em ADE, observou-se a separação de duas frações de esporos (Figura 3). O efeito da força centrífuga permite a separação das frações de esporos após centrifugação. A fração hidrofóbica partilha para o sobrenadante e a fração hidrofílica concentra-se no fundo do tubo na ADE (Antunes et al. 2017).

A estirpe de *B. cereus* NCTC 11143 em estudo neste trabalho produz dois tipos de esporos, representados pelas frações do topo e do fundo. Estas frações diferenciam-se entre si essencialmente pela sua hidrofobicidade. No caso específico desta estirpe, as hidrofobicidades médias são: esporos do topo  $\bar{x} = 70\% \pm 2\%$ ; esporos do fundo  $\bar{x} = 32\% \pm 7\%$  (resultados não publicados, provenientes de trabalhos prévios realizados no LBDB e gentilmente cedidos pelo Major Antunes). Na Figura 4, na microscopia ótica (4A e 4B) podemos observar que os esporos refrateis no contraste de fase correspondem aos esporos viáveis e os esporos mais escuros representam os esporos em processo de germinação. Relativamente à microscopia eletrónica (Figura 4C e 4D), podemos observar a integridade dos esporos e o apêndice do exósporo salientado pela seta amarela.



**Figura 4: Caracterização das subpopulações de esporos de *B. cereus* estirpe NCTC 11143 por microscopia ótica e microscopia eletrônica de varrimento. 4A: Esporos do topo por microscopia ótica de contraste de fase. 4B: Esporos do fundo por microscopia ótica de contraste de fase. 4C: Esporos do topo por microscopia eletrônica de varrimento. 4D: Esporos do fundo por microscopia eletrônica de varrimento.**

A quantificação das frações de esporos desta estirpe apresenta uma diferença marcante em termos de título, após a purificação. Os resultados apresentados na Tabela 3 correspondem à contagem de ufc/mL das colônias em meio de PCA. Analisando os resultados da quantificação podemos verificar, que a fração dos esporos do fundo está mais concentrada ( $5.63 \times 10^9$  ufc/mL) do que os esporos do topo ( $5.90 \times 10^8$  ufc/mL). A diferença entre ambas as frações é de aproximadamente uma casa logarítmica, no entanto este resultado é fruto de uma observação resultante de um processo de purificação, que possuía apenas como objetivo final obter esporos com elevada pureza e integridade estrutural.

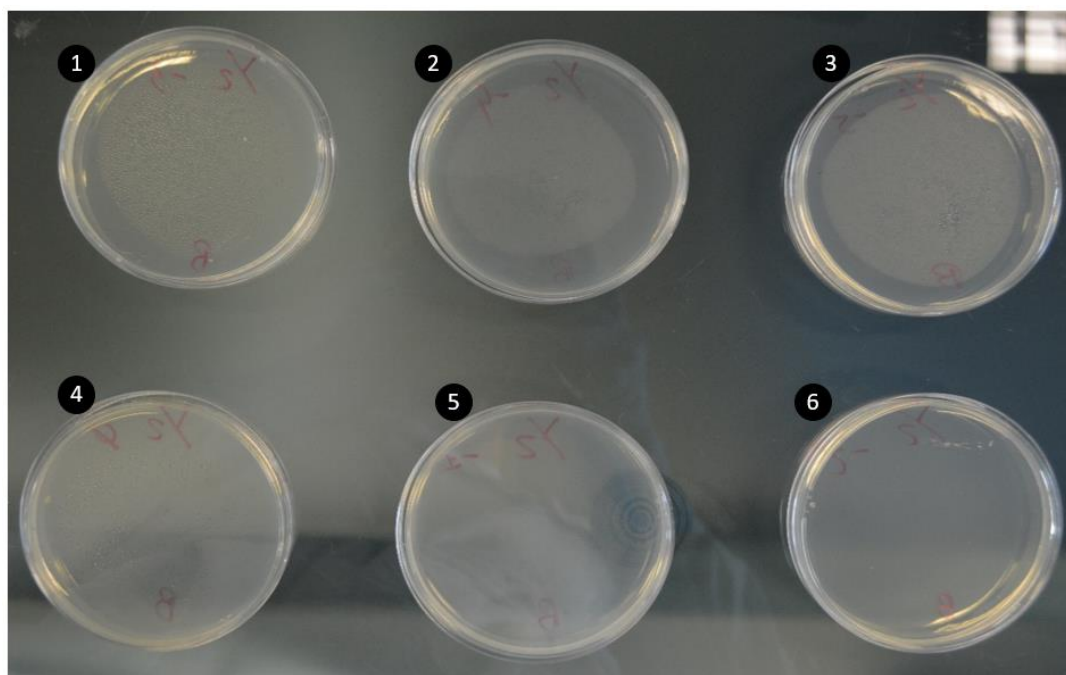
**Tabela 3: Quantificação de ambas as subpopulações de esporos de *B. cereus***

| <b><i>B. cereus</i> (NCTC 11143)</b> |                  | <b>nº ufc/mL</b>     | <b>Média ufc/mL</b>        | <b>Desvio-padrão</b>       |
|--------------------------------------|------------------|----------------------|----------------------------|----------------------------|
| Fração de esporos                    | nº de Repetições |                      |                            |                            |
| Esporos do topo                      | 1                | 3.00x10 <sup>8</sup> | <b>5.90x10<sup>8</sup></b> | <b>2.52x10<sup>8</sup></b> |
|                                      | 2                | 7.60x10 <sup>8</sup> |                            |                            |
|                                      | 3                | 7.10x10 <sup>8</sup> |                            |                            |
| Esporos do fundo                     | 1                | 4.90x10 <sup>9</sup> | <b>5.63x10<sup>9</sup></b> | <b>6.35x10<sup>8</sup></b> |
|                                      | 2                | 6.00x10 <sup>9</sup> |                            |                            |
|                                      | 3                | 6.00x10 <sup>9</sup> |                            |                            |

O rendimento da produção de esporos por fração não foi calculado, contudo é um aspeto importante a ter em consideração no futuro para este tipo de estirpes de *B. cereus*, pois pode constituir-se como um indicador de disseminação e contaminação ambiental, que poderá trazer informações sobre as dinâmicas entre microrganismo-hospedeiros-nichos ecológicos.

Nas experiências de descontaminação efetuadas com o peróxido de hidrogénio líquido a 10%, os resultados obtidos indicam que nesta concentração, o peróxido possui ação esporicida sobre a população total de esporos de *B. cereus* estirpe NCTC 11143, tanto em superfícies limpas como em superfícies sujas com óleo para fins alimentares.

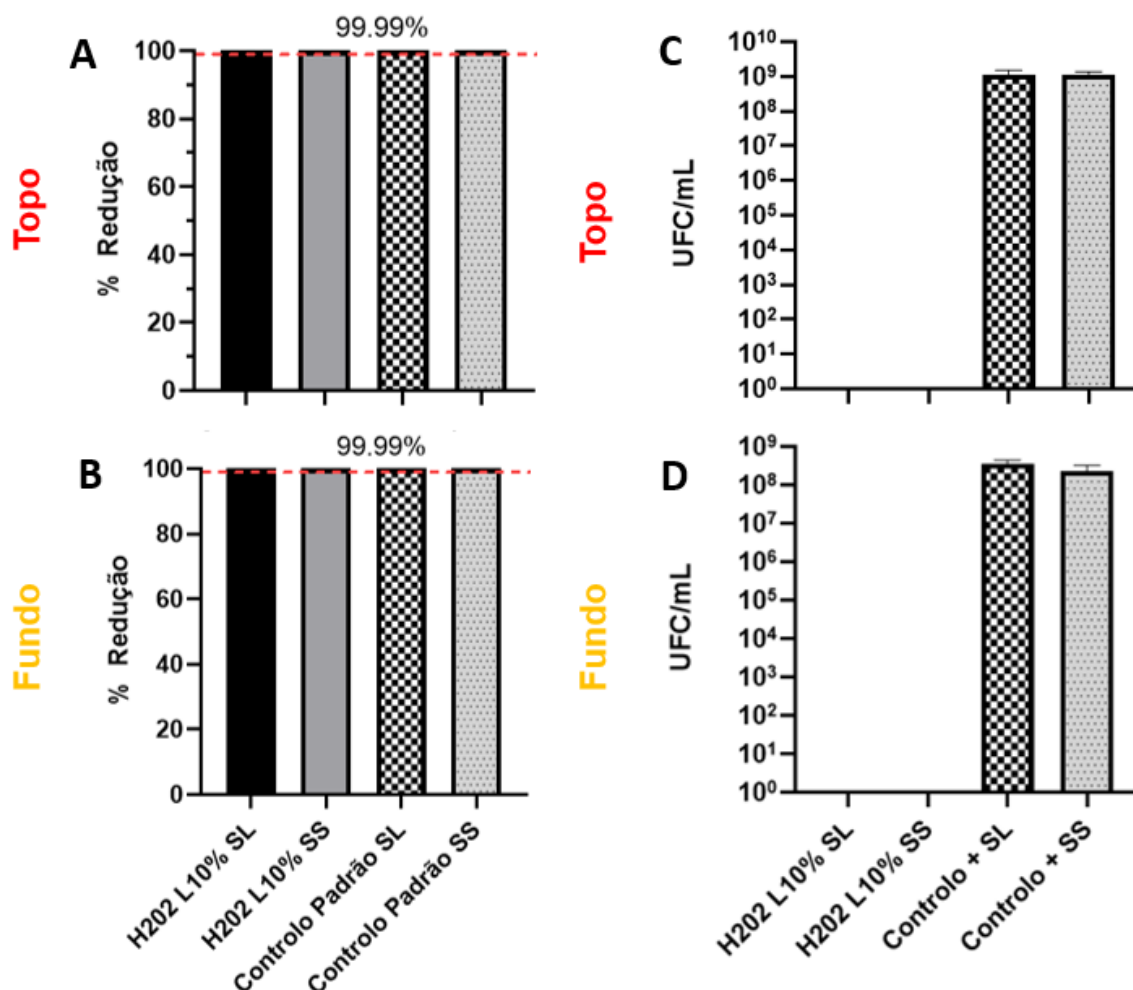
Observa-se na Figura 5 uma fotografia das placas de PCA descontaminadas com peróxido de hidrogénio líquido a 10%, após incubação dos esporos do fundo de *B. cereus* imersos em óleo alimentar, na qual podemos observar a ausência de crescimento de colónias bacterianas.



**Figura 5: Placas de PCA incubadas com esporos do fundo de *B. cereus*, oriundos de matriz tratada com óleo alimentar e descontaminadas com peróxido de hidrogénio líquido a 10%.**

Na descontaminação efetuada com o controlo padrão (ácido peracético a 0.1%), ocorreu o mesmo fenómeno observado na figura anterior, não se obtendo qualquer tipo de crescimento de colónias provenientes do tratamento dos esporos do fundo e do topo, em ambas as superfícies em estudo.

As experiências de descontaminação efetuadas com peróxido de hidrogénio líquido a 10% demonstraram uma redução de 8 log para os esporos do topo ( $5.90 \times 10^8$  ufc/mL) e uma redução de 9 log para os esporos do fundo ( $5.63 \times 10^9$  ufc/mL) da estirpe de *B. cereus* em análise.



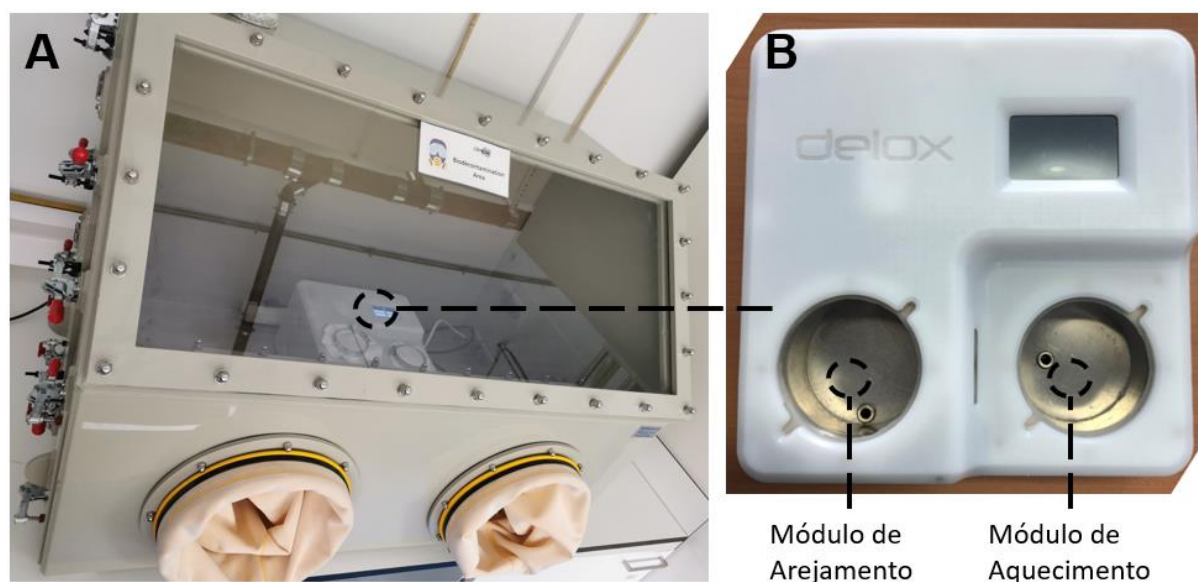
**Figura 6: Resultados da descontaminação com peróxido de hidrogénio líquido a 10% das subpopulações de esporos de *B. cereus* estirpe NCTC 11143. 6A: Percentagem de redução dos esporos do topo. 6B: Percentagem de redução dos esporos do fundo. 6C: ufc/mL dos esporos do topo. 6D: ufc/mL dos esporos do fundo.**

Na Figura 6A e 6B podemos observar uma percentagem de redução de 100% em ambas as frações de esporos de *B. cereus* (NCTC 11143), após a descontaminação com peróxido de hidrogénio líquido a 10% e com ácido peracético líquido a 0.1% (controlo padrão). Estes resultados indicam que o peróxido de hidrogénio líquido a 10% e o ácido peracético a 0.1% possuem ação esporicida, nas condições experimentais testadas, tanto em superfícies limpas como em superfícies sujas com óleo alimentar.



O descontaminante de partículas oxidantes aplicado por aerossol gasoso é uma formulação de peróxido de hidrogénio desenvolvido pela Delox. Esta tecnologia de descontaminação designa-se por dryVHP e consiste numa formulação sólida inorgânica, capaz de concentrar e libertar o vapor de peróxido de hidrogénio a baixas temperaturas (60°C).

O processo de descontaminação efetuado pela tecnologia dryVHP foi realizado no interior da câmara de isolamento em PVC (Figura 7A) nas instalações da Delox. O equipamento portátil de descontaminação desenvolvido pela Delox (Figura 7B) é um sistema compacto, robusto, leve, fácil de operar, permitindo superar as limitações dos sistemas tradicionais de VHP (custo, manutenção, transporte e compatibilidade com os materiais). A formulação seca de dryVHP é fácil de manusear e foi aplicada no módulo de aquecimento e a descontaminação foi efetuada consoante os procedimentos descritos no subcapítulo 4.14., segundo o esquema experimental ilustrado na Figura 7A.

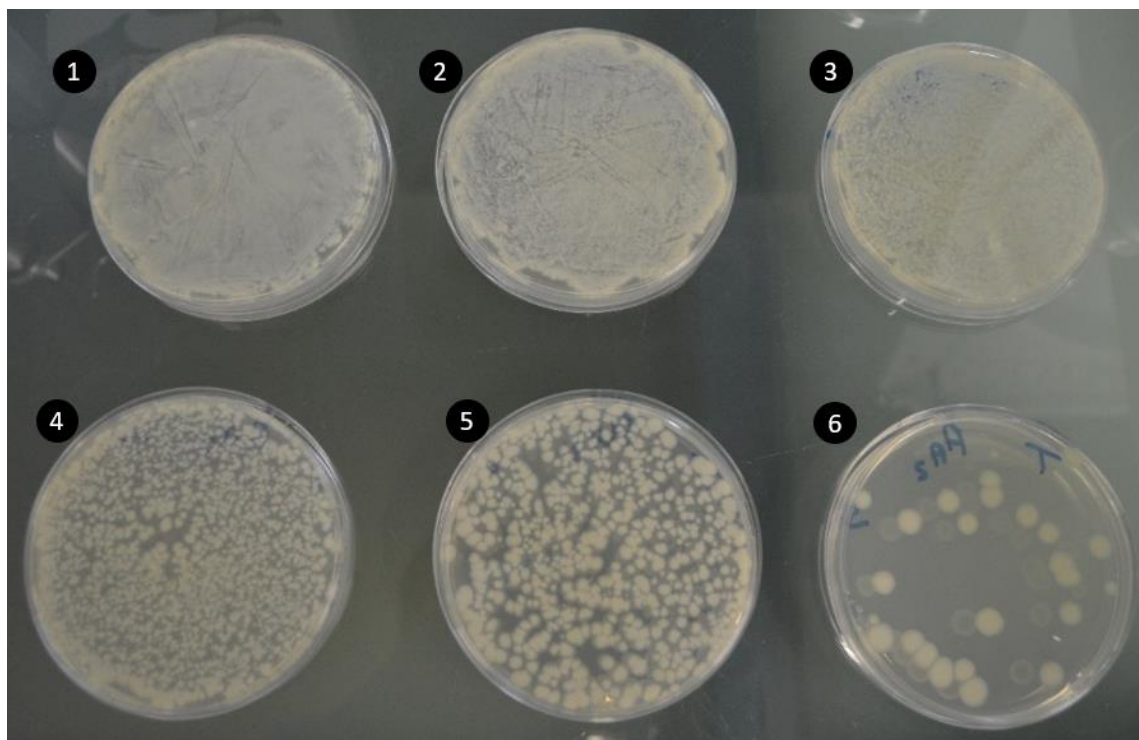


**Figura 7: Aparelhos de descontaminação da Delox. 7A: Câmara de isolamento dentro da qual se realiza a descontaminação por dryVHP. 7B: Equipamento portátil de descontaminação desenvolvido pela Delox que dispersa o dryVHP por aerossolização.**

A descontaminação dos esporos da fração do topo de *B. cereus* NCTC 11143 em ambas as superfícies limpas e sujas, empregando a tecnologia dryVHP apresentou resultados insatisfatórios, não havendo atividade esporificada comparativamente com o peróxido de hidrogénio líquido 10% e com o ácido peracético 0.1%. Na Figura 8 é possível observar crescimento de colónias em meio de PCA, nas diferentes diluições efetuadas para titulação dos esporos.

A análise de resultados mostra que a percentagem de redução log média dos esporos do topo de *B. cereus* NCTC 11143, após a descontaminação com peróxido de hidrogénio

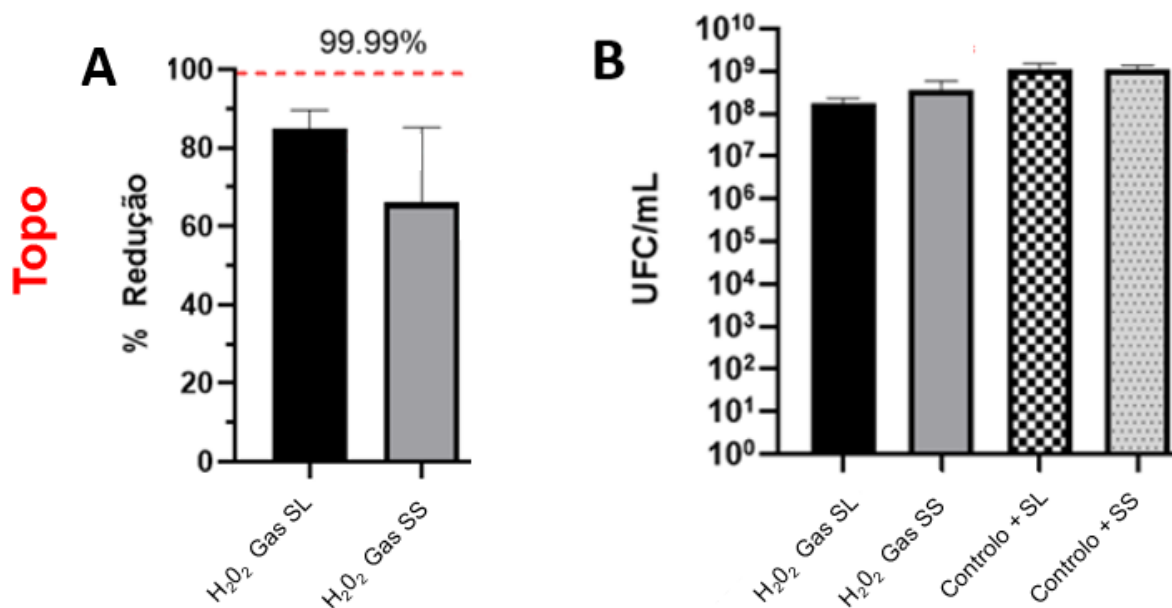
gasoso (dryVHP) é inferior a 99.99%, nas duas superfícies testadas (Figura 9A). Apesar da ausência de efeito esporicida pelo tratamento por dryVHP, em esporos da fração do topo, conseguimos observar uma ligeira redução nos títulos finais dos esporos desta fração ( $1.77 \times 10^8$  ufc/mL em SL e  $3.77 \times 10^8$  ufc/mL em SS), comparativamente com os controles positivos para cada superfície em estudo ( $1.16 \times 10^9$  ufc/mL em SL e  $1.11 \times 10^9$  ufc/mL em SS) (Anexo 9 e Anexo 11).



**Figura 8: Placas de PCA incubadas com esporos do topo de *B. cereus*, oriundos de matriz tratada com óleo alimentar e descontaminadas com peróxido de hidrogénio gasoso (dryVHP).**

Os resultados de descontaminação obtidos para os esporos do topo de *B. cereus* NCTC 11143 após descontaminação com dryVHP foram de 84.77% em superfícies limpas e de 66.07% em superfícies sujas com óleo alimentar (Tabela 4). É perceptível que após a descontaminação efetuada pela Delox com dryVHP, os esporos do topo de *B. cereus* NCTC 11143 imersos em óleo alimentar apresentam uma contagem média de ufc/mL superior aos esporos descontaminados em superfícies limpas ( $3.77 \times 10^8$  ufc/mL >  $1.77 \times 10^8$  ufc/mL). Estes resultados sugerem que o óleo alimentar cria uma barreira protetora que dificulta a difusão do dryVHP, reduzindo a sua atividade oxidativa sobre os esporos a descontaminar.





**Figura 9: 9A: Percentagem de redução dos esporos do topo de *B. cereus*, após descontaminação com peróxido de hidrogénio gasoso (dryVHP). 9B: Contagens das ufc/mL dos esporos do topo de *B. cereus* com os respetivos controlos positivos, após descontaminação com peróxido de hidrogénio gasoso (dryVHP).**

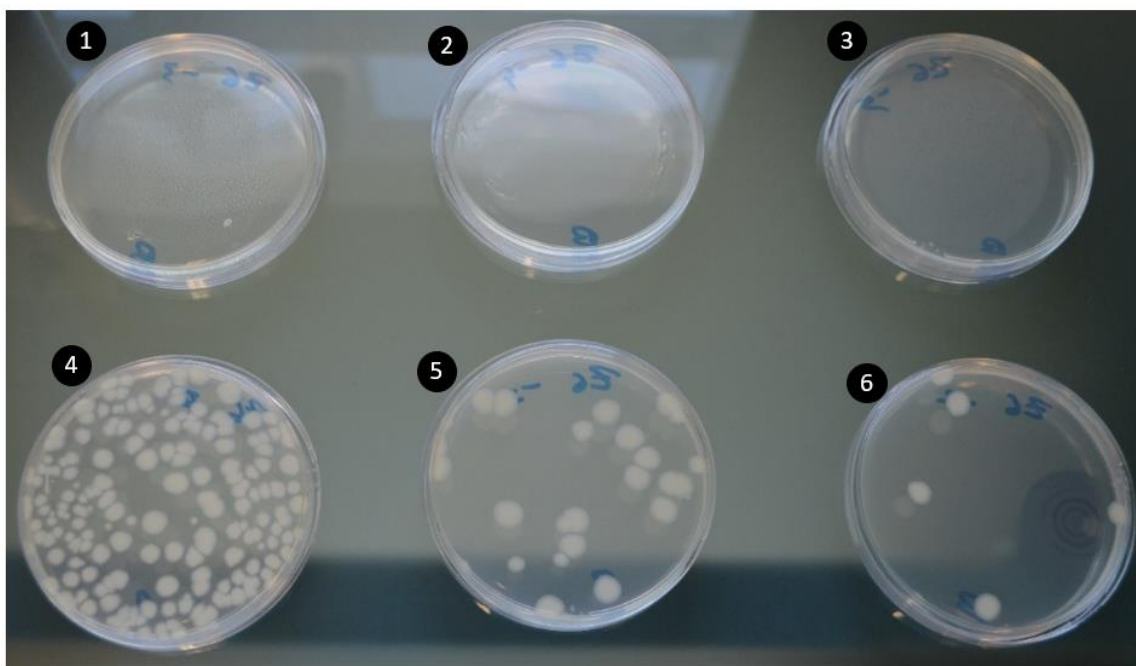
Com o intuito de compreender se as diferenças observadas entre os esporos das superfícies descontaminadas (limpas e sujas) foram resultantes da ação protetora do óleo alimentar, efetuamos uma análise estatística utilizando o teste não paramétrico de *Mann-Whitney* (Anexo 15). O teste revelou que a diferença existente entre os resultados da descontaminação por dryVHP, das superfícies limpas e superfícies sujas, possui relevância estatística ( $p=0.0411$ , para um valor de  $p < 0.05$ ). Estes dados corroboram a hipótese das diferenças obtidas no processo de descontaminação serem motivadas pela presença do óleo alimentar.

**Tabela 4: Valores das ufc/mL dos esporos do topo de *B. cereus* após descontaminação com peróxido de hidrogénio gasoso (dryVHP) nas duas superfícies em análise.**

| <b><i>B. cereus</i> (NCTC 11143)</b>        |                  |                      |                            |             |                 |                       |                   |
|---|------------------|----------------------|----------------------------|-------------|-----------------|-----------------------|-------------------|
| Esporos do topo                             | nº de Repetições | nº ufc/mL            | Média ufc/mL               | Redução log | Redução log (%) | Redução log média (%) | Desvio-padrão (%) |
| <b>Superfícies limpas</b>                   | 1                | 1.36x10 <sup>8</sup> | <b>1.77x10<sup>8</sup></b> | 0.93        | 88.28%          | <b>84.77%</b>         | <b>4.84%</b>      |
|   | 2                | 1.64x10 <sup>8</sup> |                            | 0.85        | 85.86%          |                       |                   |
|   | 3                | 2.16x10 <sup>8</sup> |                            | 0.73        | 81.38%          |                       |                   |
|   | 4                | 2.12x10 <sup>8</sup> |                            | 0.74        | 81.72%          |                       |                   |
|   | 5                | 2.40x10 <sup>8</sup> |                            | 0.68        | 79.31%          |                       |                   |
|   | 6                | 9.20x10 <sup>7</sup> |                            | 1.10        | 92.07%          |                       |                   |
| <b>Superfícies sujas com óleo alimentar</b> | 1                | 5.90x10 <sup>8</sup> | <b>3.77x10<sup>8</sup></b> | 0.27        | 46.85%          | <b>66.07%</b>         | <b>19.14%</b>     |
|   | 2                | 2.60x10 <sup>8</sup> |                            | 0.63        | 76.58%          |                       |                   |
|   | 3                | 3.80x10 <sup>8</sup> |                            | 0.47        | 65.77%          |                       |                   |
|   | 4                | 6.70x10 <sup>8</sup> |                            | 0.22        | 39.64%          |                       |                   |
|   | 5                | 2.20x10 <sup>8</sup> |                            | 0.70        | 80.18%          |                       |                   |
|   | 6                | 1.40x10 <sup>8</sup> |                            | 0.90        | 87.39%          |                       |                   |

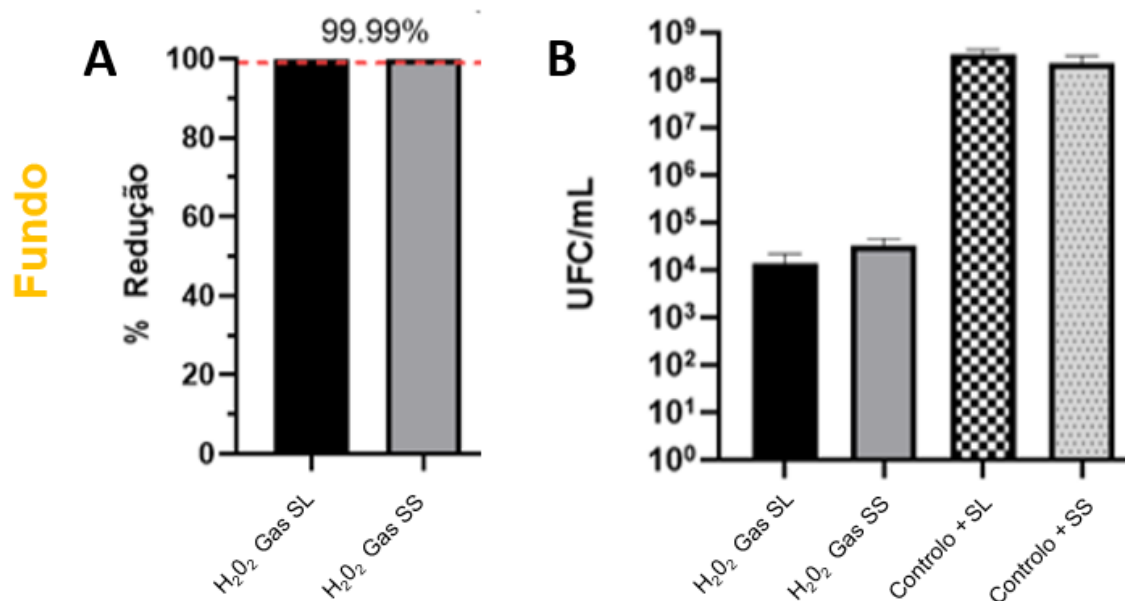
A descontaminação dos esporos da fração do fundo de *B. cereus* NCTC 11143 em ambas as superfícies limpas e sujas, empregando a tecnologia dryVHP apresentou resultados satisfatórios, tendo ocorrido atividade esporicida comparativamente com o dryVHP para os esporos do topo. Na Figura 10 é possível observar crescimento de colónias em meio de PCA, nas diluições -5, -4 e -3 efetuadas para titulação dos esporos (placas 4), 5) e 6) respetivamente).

A análise de resultados mostra que a percentagem de redução log média dos esporos do fundo de *B. cereus* NCTC 11143, após a descontaminação com peróxido de hidrogénio gasoso (dryVHP) é de 99.99%, nas duas superfícies testadas (gráfico Figura 11A). Apesar do efeito esporicida pelo tratamento por dryVHP, é importante salientar que os resultados obtidos em superfícies sujas com óleo alimentar estão no limiar da descontaminação. Isto porque 2 das 6 repetições efetuadas apresentaram uma redução log de 99.98% após descontaminação por dryVHP (salientadas a vermelho na Tabela 5). Apesar desta discrepância, a média da descontaminação nas 6 repetições efetuadas foi de 99.99%, o que confirma a eficácia do método de descontaminação desenvolvido pela Delox relativamente aos esporos do fundo de *B. cereus* NCTC 11143. Nos esporos da fração do fundo, conseguimos observar uma redução nos títulos finais dos esporos desta fração (1.72x10<sup>4</sup> ufc/mL em SL e 3.33x10<sup>4</sup> ufc/mL em SS), comparativamente com os controlos positivos para cada superfície em estudo (3.55x10<sup>8</sup> ufc/mL em SL e 2.30x10<sup>8</sup> ufc/mL em SS) (Anexo 10 e Anexo 12).



**Figura 10: Placas de PCA incubadas com esporos do fundo de *B. cereus*, oriundos de matriz em superfície limpa e descontaminadas com peróxido de hidrogênio gasoso (dryVHP).**

Os resultados de descontaminação obtidos para os esporos do fundo de *B. cereus* NCTC 11143 após descontaminação com dryVHP foram de 99.99% em superfícies limpas e superfícies sujas com óleo alimentar (Tabela 5). É perceptível que após a descontaminação efetuada pela Delox com dryVHP, os esporos do fundo de *B. cereus* NCTC 11143 imersos em óleo alimentar apresentam uma contagem média de ufc/mL superior aos esporos descontaminados em superfícies limpas ( $3.33 \times 10^4$  ufc/mL >  $1.72 \times 10^4$  ufc/mL). Estes resultados sugerem, que o óleo alimentar cria uma barreira protetora que dificulta a difusão do dryVHP, reduzindo a sua atividade oxidativa sobre os esporos a descontaminar.



**Figura 11: 11A: Percentagem de redução dos esporos do fundo de *B. cereus*, após descontaminação com peróxido de hidrogénio gasoso (dryVHP). 11B: Contagens das ufc/mL dos esporos do fundo de *B. cereus* com os respetivos controlos positivos, após descontaminação com peróxido de hidrogénio gasoso (dryVHP).**

Com o intuito de compreender se as diferenças observadas entre os esporos das superfícies descontaminadas (limpas e sujas) foram resultantes da ação protetora do óleo alimentar, efetuamos uma análise estatística utilizando o teste não paramétrico de *Mann-Whitney* (Anexo 16). O teste revelou que a diferença existente entre os resultados da descontaminação por dryVHP, das superfícies limpas e superfícies sujas, possui relevância estatística ( $p=0.0022$ , para um valor de  $p < 0.05$ ). Estes dados corroboram, à semelhança do que aconteceu no capítulo precedente, a hipótese das diferenças obtidas no processo de descontaminação serem motivadas pela presença do óleo alimentar.

**Tabela 5: Valores das ufc/mL dos esporos do fundo de *B. cereus* após descontaminação com peróxido de hidrogénio gasoso (dryVHP) nas duas superfícies em análise.**

| <b><i>B. cereus</i> (NCTC 11143)</b>        |                  |                      |                            |             |                 |                       |                   |
|---|------------------|----------------------|----------------------------|-------------|-----------------|-----------------------|-------------------|
| Esporos do fundo                            | nº de Repetições | nº ufc/mL            | Média ufc/mL               | Redução log | Redução log (%) | Redução log média (%) | Desvio-padrão (%) |
| <b>Superfícies limpas</b>                   | 1                | 2.30x10 <sup>4</sup> | <b>1.72x10<sup>4</sup></b> | 4.19        | 99.99%          | <b>99.99%</b>         | <b>0.00%</b>      |
|   | 2                | 1.30x10 <sup>4</sup> |                            | 4.44        | 99.99%          |                       |                   |
|   | 3                | 2.20x10 <sup>4</sup> |                            | 4.21        | 99.99%          |                       |                   |
|   | 4                | 1.00x10 <sup>4</sup> |                            | 4.55        | 99.99%          |                       |                   |
|   | 5                | 1.20x10 <sup>4</sup> |                            | 4.47        | 99.99%          |                       |                   |
|   | 6                | 2.30x10 <sup>4</sup> |                            | 4.19        | 99.99%          |                       |                   |
| <b>Superfícies sujas com óleo alimentar</b> | 1                | 5.90x10 <sup>4</sup> | <b>3.33x10<sup>4</sup></b> | 4.11        | 99.99%          | <b>99.99%</b>         | <b>0.01%</b>      |
|   | 2                | 2.60x10 <sup>4</sup> |                            | 3.96        | 99.99%          |                       |                   |
|   | 3                | 3.80x10 <sup>4</sup> |                            | 3.87        | 99.99%          |                       |                   |
|   | 4                | 6.70x10 <sup>4</sup> |                            | 3.74        | 99.98%          |                       |                   |
|   | 5                | 2.20x10 <sup>4</sup> |                            | 3.91        | 99.99%          |                       |                   |
|   | 6                | 1.40x10 <sup>4</sup> |                            | 3.61        | 99.98%          |                       |                   |

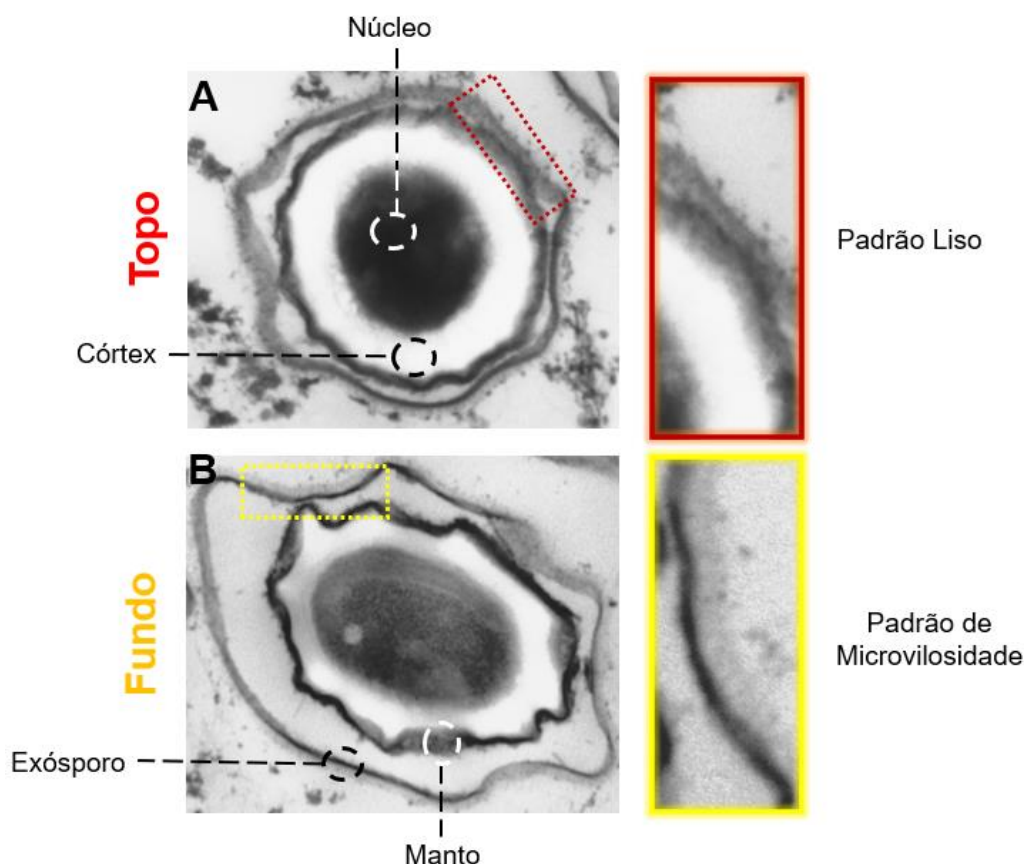
Todos estes resultados indicam que a descontaminação efetuada com o peróxido de hidrogénio gasoso desenvolvido pela Delox (dryVHP) foi eficiente para os esporos do fundo de *B. cereus* NCTC 11143 em superfícies limpas e em superfícies sujas com óleo alimentar. Ao contrário dos resultados obtidos para os esporos do topo, relativamente aos esporos do fundo ocorreu ação esporicida com esta metodologia descontaminante nas condições experimentais testadas.

## 6. DISCUSSÃO

*B. cereus* é uma espécie telúrica que ocupa diversos *habitats* ecológicos e, devido à formação de endósporos extremamente resistentes, as bactérias podem persistir num estado dormente por longos períodos de tempo. Esta característica de elevada resistência faz com que se comportem como organismos ubiqüitários, podendo contaminar vários pontos da cadeia alimentar, especialmente locais onde as formas vegetativas não teriam qualquer probabilidade de se estabelecer, devido à ausência de nutrientes ou devido às condições ambientais extremas (calor, agentes desinfetantes e descontaminantes). O *B. cereus* pode infetar os funcionários durante a produção e o processamento dos alimentos e durante as operações de manejo dos animais. O solo e seus organismos, incluindo plantas, insetos e nemátodos são os principais reservatórios de esporos bacterianos. Sendo assim, o homem pode infetar-se através da ingestão, inalação e de feridas cutâneas por exemplo. Os têxteis produzidos com produtos de origem animal são também vetores de transmissão destas bactérias aos seres humanos (Ehling-Schulz et al. 2019).

A estirpe de *B. cereus* NCTC 11143 estudada neste trabalho produz duas frações de esporos, do topo e do fundo, que se diferenciam entre si essencialmente pelas suas propriedades físico-químicas, nomeadamente a nível da hidrofobicidade. As hidrofobicidades médias desta estirpe situam-se entre os 70%, para os esporos do topo e os 32%, para os esporos do fundo. A característica hidrofóbica dos esporos do grupo *B. cereus* sensu lato é determinada em grande parte pelo exósporo, sendo que a formação deficiente desta estrutura reduz significativamente a hidrofobicidade dos esporos (Bressuire-Isoard et al. 2016). O exósporo do *B. cereus* apresenta uma composição bioquímica constituída principalmente por proteínas (52%), polissacáridos neutros (20%) e por lípidos (20%) (Matz et al. 1970). No entanto, não se sabe qual a composição diferencial do exósporo entre os esporos do topo e do fundo, dentro da mesma estirpe de *B. cereus*. No entanto suspeita-se que haja uma diferença significativa, num ou em vários componentes, dado os valores de hidrofobicidade obtidos nos testes de partilha fase aquosa-fase orgânica.

O exósporo é a camada mais externa do endósporo, sendo o seu componente maioritário a glicoproteína BclA, uma proteína glicosilada (Bressuire-Isoard et al. 2016). O nível de glicosilação difere entre as várias estirpes de *B. cereus*, e muito provavelmente até dentro da mesma estirpe. Trabalhos anteriores efetuados no LBDB e ainda não publicados, mostram que existem diferenças na arquitetura da superfície do exósporo entre as duas frações de esporos de *B. cereus* NCTC 11143 (Figura 12). Estes resultados sugerem que o padrão de glicosilação nesta estirpe é diferente entre esporos da fração do topo e a fração do fundo. As imagens de microscopia eletrónica de transmissão (TEM) mostram a presença de uma ornamentação de glicoproteínas na superfície dos esporos do fundo, bem mais desenvolvida, do que na superfície dos esporos do topo. Podemos afirmar que a ornamentação glicoproteica na superfície dos esporos do fundo é maior, pois as análises dos esporos por TEM foi realizada utilizando um corante específico para açúcares, o vermelho de ruténio. O emprego deste corante vai revelar uma maior densidade eletrónica nas zonas da amostra onde haja uma maior concentração de açúcares (Waller et al. 2004). Neste caso específico os açúcares encontram-se ligados maioritariamente na proteína BclA, daí os esporos do fundo apresentarem na sua superfície um padrão tipo “microvilosidade”, enquanto os esporos do topo parecem lisos (ver na Figura 12 a seção em corte da superfície aumentada).



**Figura 12: Diferente padrão de glicosilação do exósporo da estirpe de *B. cereus* NCTC 11143, entre as frações do topo e do fundo. 12A: Microscopia eletrônica de transmissão dos esporos do topo. 12B: Microscopia eletrônica de transmissão dos esporos do fundo.**

No presente trabalho de investigação não foi quantificada a percentagem de glicosilação das superfícies dos esporos do fundo e do topo, no entanto este é um aspeto importante a determinar em trabalhos futuros, para perceber se existem diferenças significativas de glicosilação entre as duas frações de esporos de *B. cereus* NCTC 11143. As diferenças de glicosilação da BclA podem influenciar o nível de hidrofobicidade dos esporos de *B. cereus* (Bressuire-Isoard et al. 2016). Com base nesta informação, é provável que os esporos do fundo sejam mais glicosilados do que os esporos do topo, e por isso mais hidrofílicos. Pelo mesmo raciocínio, é provável que os esporos do topo sejam mais hidrofóbicos por serem menos glicosilados, sendo esta conclusão suportada pelos valores de hidrofobicidade apresentados anteriormente.

As propriedades hidrofóbicas dos esporos de *B. cereus* são importantes nas relações físico-químicas entre os esporos e a água e podem potencialmente reduzir o contato e a penetração dos desinfetantes de base aquosa e gasosa (Silva et al. 2013). Os esporos do topo são hidrofóbicos e por isso vão repelir a água e as moléculas hidrófilas. No caso de descontaminantes compostos por moléculas hidrófilas, as forças de repulsão vão atuar de forma a excluírem as moléculas ativas da superfície dos esporos do topo, daí eles apresentarem uma maior resistência a esta tipologia de descontaminantes. No caso do

peróxido de hidrogénio que é um descontaminante de base hidrófila, nós não observamos esse fenómeno no nosso trabalho experimental, pois as concentrações utilizadas para a descontaminação eram bastante elevadas (peróxido de hidrogénio a 10%). Pensamos que este fenómeno seja observável para concentrações de peróxido de hidrogénio, muito próximas ao limiar da ação esporicida.

O peróxido de hidrogénio gasoso é um gás polar e os fenómenos de repulsão superficial devem ser ainda mais importantes nesta fase, durante o processo de descontaminação, do que em meio aquoso. Em meio aquoso existe mais água de solvatação disponível, condição essencial para que as moléculas ativas exerçam a sua atividade oxidante sobre a superfície do material a descontaminar (McDonnell 2017). Este fenómeno justifica que as propriedades físico-químicas devem ser as principais responsáveis pelas resistências diferenciais serem tão marcadas quando se testou o peróxido de hidrogénio gasoso nas frações do topo e do fundo com a descontaminação por dryVHP. De facto, os esporos do topo foram resistentes à descontaminação com uma percentagem de redução log média de 84.77% em superfícies limpas. Na presença de óleo alimentar os esporos aumentam a sua resistência ao dryVHP, com valores de redução log que descem para os 66.07%. Nos esporos do fundo, a descontaminação por dryVHP é eficaz, tanto em superfícies limpas como sujas com óleo alimentar, com uma percentagem de redução log média de 99.99%. Quando se recorre à descontaminação aquosa por imersão, os efeitos da hidrofobicidade de superfície e o efeito protetor do óleo são atenuados, ocorrendo descontaminação total (> 99.99%) nas duas frações de esporos de *B. cereus*.

Tendo em conta estes resultados, é muito provável que a hidrofobicidade esteja envolvida neste processo de resistência diferencial, bem visível durante a descontaminação por dryVHP. Os esporos mais hidrofílicos (do fundo) devem permitir uma maior permeabilidade ao descontaminante gasoso levando à oxidação dos recetores responsáveis pela germinação, por isso apresentam menor resistência que os esporos hidrofóbicos (do topo). Um estudo reportou que a adsorção global do peróxido de hidrogénio é mais elevada em superfícies e material hidrofílico do que em material hidrofóbico, logo os microrganismos mais hidrofílicos apresentam uma maior afinidade para o peróxido de hidrogénio resultando numa ação mais eficaz do descontaminante (Eschlbeck et al. 2020). Pensamos que os resultados obtidos por Eschlbeck et al. 2020, corroboram os resultados apresentados neste trabalho.

Na concentração de 10% do peróxido de hidrogénio líquido corresponde à concentração mínima utilizada para digerir matéria orgânica (McDonnell 2017). Esta concentração possui ação esporicida em ambas as frações dos esporos de *B. cereus*, nomeadamente quando empregue por imersão. O peróxido de hidrogénio possui diversas vantagens, nomeadamente um elevado poder oxidante, é moderadamente estável, barato,



facilmente disponível e consegue decompor-se rapidamente em água e oxigénio após descontaminação sem produzir resíduos tóxicos. Este descontaminante líquido, em baixas concentrações (3% a 6%), é geralmente seguro mas pouco eficaz e sem capacidade esporicida (McDonnell 2017). No entanto, este descontaminante é corrosivo em concentrações elevadas (35% a 50%), podendo provocar danos em diferentes materiais (eletrónicos por exemplo), expondo os seres humanos a diversos perigos de saúde (queimaduras cutâneas por exemplo) (McDonnell 2017). O peróxido de hidrogénio líquido a 10% é muito eficaz em condições laboratoriais, no entanto existem vários fatores limitantes quando empregue nas indústrias, nos hospitais e outros edifícios, sobretudo por não ser viável imergir na totalidade as superfícies a descontaminar e pelas incompatibilidades com diversos materiais.

Os produtos que utilizam o ácido peracético são geralmente alguns dos esporicidas líquidos mais eficazes do mercado (Wood and Adrion 2019). O ácido peracético possui diversas vantagens, nomeadamente um largo espectro de ação em concentrações baixas (0.1% a 0.3%) e com elevado poder oxidante. Possui uma boa difusão e decompõe-se sem resíduos tóxicos. Utiliza-se geralmente o ácido peracético na indústria alimentar, no entanto, é um descontaminante caro que apresenta problemas de estabilidade quando empregue a baixas concentrações e potencialmente explosivo a concentrações elevadas. Pode causar queimaduras cutâneas em concentrações superiores a 3% e danos oculares quando superior a 0.3% e requer manipuladores experientes para ser eficaz. Este descontaminante é também altamente corrosivo para metais e componentes eletrónicos (McDonnell 2017).

O peróxido de hidrogénio gasoso vaporizado (VHP) é o descontaminante de eleição para espaços interiores (salas, edifícios, viaturas), sendo seguro, de largo espectro, compatível com diversos materiais e é utilizado para processos de fumigação e esterilização (Khardori 2006). Observa-se uma maior eficácia em concentrações muito inferiores com o VHP, em comparação com o peróxido de hidrogénio líquido. O VHP difunde-se passivamente e decompõe-se rapidamente em água e oxigénio sem produzir resíduos tóxicos na atmosfera. No entanto, tem desvantagens pois pode provocar irritação nas mucosas mesmo em concentrações baixas (10 a 20 ppm), e por ser uma metodologia descontaminante muito cara, efetuada por máquinas pesadas que requerem elevada manutenção e consomem muita energia (McDonnell 2017). Outra desvantagem do VHP é o fenómeno da microcondensação que ocorre quando o peróxido de hidrogénio passa do estado gasoso para o estado líquido em superfícies (Wawrzyk et al. 2020). Apesar deste fenómeno permitir uma ação mais eficaz no ponto específico onde ocorre esta microcondensação, pode tornar-se incompatível com certos materiais (McDonnell 2017).

A tecnologia de descontaminação dryVHP desenvolvida pela Delox permite superar várias complexidades tradicionais dos sistemas VHP, relativamente ao custo, manutenção,

transporte do equipamento e compatibilidade com os materiais. DryVHP permite descontaminar várias infraestruturas e os vaporizadores que utilizam esta tecnologia são máquinas simples, robustas, com elevada portabilidade, podendo ser sujeitos a choques e vibrações sendo por isso ideais para uma utilização operacional pelo Exército. No entanto esta tecnologia também possui desvantagens, pois só funciona em ambientes interiores e é uma tecnologia lenta na difusão do peróxido de hidrogénio. A microcondensação também pode ser uma problemática da técnica por dryVHP e pode provocar a corrosão de algumas superfícies. Existem várias aplicações potenciais desta tecnologia no campo da descontaminação de interiores, a nível de viaturas (ambulâncias), edifícios (hospitais) e diversos equipamentos sensíveis (câmaras de fluxo laminar, equipamentos de PCR, equipamentos eletrónicos) (Delox 2021).

*B. cereus* é uma espécie saprófita, cumpre os seus ciclos de vida no meio ambiente e coloniza nichos ecológicos muito diversos, incluindo o solo e o trato gastrointestinal de invertebrados e vertebrados e produz potencialmente esporos com propriedades muito diferentes. As condições físicas e químicas prevalentes em tais nichos desempenham um papel importante no desencadeamento da esporulação e na determinação das propriedades finais dos esporos (Bressuire-Isoard et al. 2016). Como o ambiente onde os esporos de *B. cereus* se encontram é tão diverso, é muito provável que esta estirpe esteja adaptada para colonizar ambientes aquáticos como também ambientes secos.

Neste trabalho, à semelhança dos resultados referidos anteriormente, estudou-se um microrganismo que produz duas subpopulações de esporos, para poder colonizar diferentes *habitats* e garantir assim uma maior capacidade de sobrevivência e colonização nesses ambientes diversos. Por exemplo, os esporos hidrofílicos (esporos do fundo) parecem estar mais adaptados a ambientes aquáticos, incluído o tubo digestivo de animais, e apresentam maior hidrofília para poderem colonizar a mucosa gastrointestinal e outras superfícies que apresentem um elevado teor em água (como por exemplo rios, charcos, poças, etc.). Em contrapartida os esporos hidrofóbicos (esporos do topo) parecem estar associados à colonização de *habitats* que não envolvem elevado teor em água, ambientes mais secos. É muito provável que o mecanismo de disseminação destes esporos hidrofóbicos seja diferente dos hidrofílicos, e que seja mais provável disseminarem-se por via aerógena e de aderirem a superfícies, seja por exemplo, na carapaça de insetos, nos pelos dos animais ou mesmo na pele de seres humanos.

As duas frações de esporos analisadas neste estudo demonstram ter diferentes resistências relativamente aos descontaminantes. O meio ambiente (particularmente a temperatura), tem uma grande influência na resistência dos esporos ao calor húmido e aos raios UV (Bressuire-Isoard et al. 2016). Sendo assim, os esporos que se disseminam mais num ambiente seco vão necessariamente estar expostos a diferentes agentes agressores,

nomeadamente aos raios UV. Tendo em conta estas informações, os esporos hidrofóbicos precisam de ser mais resistentes do que os esporos que se disseminam melhor por via aquática (os que se encontram no trato gastrointestinal por exemplo).

Segundo Begyn (2019), uma radiação UV de intensidade 164 mJ/cm<sup>2</sup> em esporos de *B. cereus* não demonstrou redução no número dos endósporos mais resistentes. No entanto, neste estudo não foram analisadas as frações dos esporos de *B. cereus*, mas sim a população como um todo. É provável que os endósporos mais resistentes mencionados pelos autores, sejam os esporos do topo, uma vez que estes são mais expostos aos raios UV e, dessa forma, mais resistentes (Begyn et al. 2020).

O presente trabalho e respetivos resultados, corroboram esta teoria que as duas subpopulações de esporos produzidas por *B. cereus* possam estar adaptadas a *habitats* específicos, de forma a privilegiar a sua disseminação. Em matadouros por exemplo, *B. cereus* pode estar adaptada para colonizar melhor o meio ambiente. Os esporos hidrofílicos podem contaminar melhor o trato gastrointestinal e a superfície de carcaças esfoladas por exemplo. Os esporos hidrofóbicos podem estar adaptados para colonizar melhor a superfície da pele, da lã ou outro tipo de matéria à superfície dos animais. Neste contexto, os esporos hidrofóbicos podem ser mais facilmente veiculados através das correntes de ar como o ar condicionado e as vias de ar nos matadouros e nas indústrias agroalimentares, mantendo-se em suspensão e tendo maior adesão a superfícies abióticas (facas ou outros tipos de utensílios). Por outro lado, os esporos hidrofílicos podem apresentar uma maior afinidade para superfícies bióticas, como o tubo digestivo, por exemplo.

Assim, foi possível constatar que *B. cereus* NCTC 11143 produz duas subpopulações de esporos com características físico-químicas diferentes, provavelmente adaptadas a ambientes distintos, de modo a privilegiar a sua sobrevivência e disseminação.

## 7. CONCLUSÕES

Os ensaios de descontaminação à escala laboratorial efetuados no LBDBE permitem retirar as seguintes conclusões:

O peróxido de hidrogénio líquido a 10% e o ácido peracético a 0.1% são descontaminantes que possuem ação esporicida para as frações do topo e do fundo dos esporos de *B. cereus*, estirpe NCTC 11143, tanto quando aplicado em superfícies limpas, como em superfícies sujas com óleo alimentar. Foi possível determinar que o tempo de exposição de 30 minutos, para estes descontaminantes líquidos, é adequado e permite exercer atividade esporicida, garantindo desta forma uma redução total do número de esporos.

Por outro lado, o peróxido de hidrogénio gasoso (dryVHP), disperso por atomização pela Delox, demonstrou-se apenas eficaz na descontaminação dos esporos do fundo, não exercendo ação esporicida nos esporos do topo. Pensa-se que esta característica de resistência diferencial entre as duas subpopulações de esporos esteja relacionada com as suas diferenças a nível de hidrofobicidade.

O presente estudo permitiu evidenciar que o modo de aplicação do descontaminante é um fator condicionante do mecanismo de ação das substâncias ativas oxidantes, sendo responsável pela maior ou menor atividade dos compostos relativamente aos seus alvos.

O presente trabalho contribuiu para aumentar o conhecimento no âmbito da descontaminação de esporos de *B. cereus*, revelando a existência de subpopulações de esporos, e que estas são verdadeiras subpopulações uma vez que apresentam resistências diferenciais ao peróxido de hidrogénio (dryVhP). Neste estudo foram apenas testadas as resistências diferenciais dos esporos ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em matriz de plástico, no entanto não sabemos quais os resultados noutras tipologias de matrizes, tais como: aço, madeira, betão, borracha, esponja, entre outras. Será interessante no futuro, continuar a explorar o tipo de resposta obtida pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em diferentes matrizes com interesse prático, nomeadamente o dryVhP, na eficácia de descontaminação de esporos de *B. cereus*.

A descontaminação é hoje em dia uma necessidade transversal e obrigatória em várias áreas, desde a indústria, passando pela saúde até à defesa. No entanto, se os cenários de bioterrorismo são menos prováveis, os cenários de emergências biológicas provocados por agentes zoonóticos, como os surtos de gripe aviária, febre aftosa, entre outros, são bem mais plausíveis, requerendo meios de descontaminação efetivos e validados para cada situação.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- André S, Vallaëys T, Planchon S. 2017. Spore-forming bacteria responsible for food spoilage. *Res Microbiol.* 168(4):379–387. doi:10.1016/j.resmic.2016.10.003.
- Antunes W, Fonseca P, Freitas J, Gomes I, Alonso C, Matos A. 2017. Ultrastructural characterization of *Bacillus anthracis* spores: The existence of two spores subpopulations? *Ultrastructural Pathology.* 41(1):104–104.
- Bacterial Endospores | Department of Microbiology. Cornell College of Agriculture and Life Sciences. [accessed 2021 Mar 21]. <https://micro.cornell.edu/research/epulopiscium/bacterial-endospores/>.
- Basta M, Annamaraju P. 2020. *Bacterial Spores*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL). <http://europepmc.org/books/NBK556071>.
- Begyn K, Kim TD, Heyndrickx M, Michiels C, Aertsen A, Rajkovic A, Devlieghere F. 2020. Directed evolution by UV-C treatment of *Bacillus cereus* spores. *International Journal of Food Microbiology.* 317:108424. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108424.
- Bressuire-Isoard C, Bornard I, Henriques AO, Carlin F, Broussolle V. 2016. Sporulation Temperature Reveals a Requirement for CotE in the Assembly of both the Coat and Exosporium Layers of *Bacillus cereus* Spores. Schaffner DW, editor. *Appl Environ Microbiol.* 82(1):232–243. doi:10.1128/AEM.02626-15.
- Buhr TL, Young AA, Bensman M, Minter ZA, Kennihan NL, Johnson CA, Bohmke MD, Borgers-Klonkowski E, Osborn EB, Avila SD, et al. 2016. Hot, humid air decontamination of a C-130 aircraft contaminated with spores of two acrySTALLIFEROUS *Bacillus thuringiensis* strains, surrogates for *Bacillus anthracis*. *J Appl Microbiol.* 120(4):1074–1084. doi:10.1111/jam.13055.
- Choi YW, Sunderman MM, McCauley MW, Richter WR, Willenberg ZJ, Wood J, Serre S, Mickelsen L, Willison S, Rupert R, et al. 2020 Jun 19. Decontamination of *Bacillus* Spores with Formaldehyde Vapor Under Varied Environmental Conditions. *Appl Biosaf.*:153567602092697. doi:10.1177/1535676020926975.
- Clair G, Esbelin J, Malléa S, Bornard I, Carlin F. 2020. The spore coat is essential for *Bacillus subtilis* spore resistance to pulsed light, and pulsed light treatment eliminates some spore coat proteins. *International Journal of Food Microbiology.* 323:108592. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108592.
- Cote CK, Heffron JD, Bozue JA, Welkos SL. 2015. *Bacillus anthracis* and Other *Bacillus* Species. In: *Molecular Medical Microbiology*. Elsevier. p. 1789–1844. [accessed 2021 Aug 30]. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123971692001025>.
- Creamer E, Humphreys H. 2008. The contribution of beds to healthcare-associated infection: the importance of adequate decontamination. *Journal of Hospital Infection.* 69(1):8–23. doi:10.1016/j.jhin.2008.01.014.
- Dancer SJ. 2014. Controlling Hospital-Acquired Infection: Focus on the Role of the Environment and New Technologies for Decontamination. *Clin Microbiol Rev.* 27(4):665–690. doi:10.1128/CMR.00020-14.
- Delox | Bio-decontamination for everyone, everywhere [accessed 2021 Apr 28]. <https://delox.pt/>.

Ehling-Schulz M, Lereclus D, Koehler TM. 2019. The *Bacillus cereus* Group: *Bacillus* Species with Pathogenic Potential. :35.

EN 13704 - Chemical disinfectants. Quantitative suspension test for the evaluation of sporicidal activity of chemical disinfectants used in food, industrial, domestic and institutional areas - Test method and requirements (phase 2, step 1) [accessed 2021 Apr 28]  
<https://www.en-standard.eu/csn-en-13704-chemical-disinfectants-quantitative-suspension-test-for-the-evaluation-of-sporicidal-activity-of-chemical-disinfectants-used-in-food-industrial-domestic-and-institutional-areas-test-method-and-requirements-phase-2-step-1-3/>

EN 14347 - Chemical disinfectants and antiseptics - Basic sporicidal activity - Test method and requirements (phase 1, step 1) [accessed 2021 Apr 28]  
<https://www.en-standard.eu/csn-en-14347-chemical-disinfectants-and-antiseptics-basicsporicidal-activity-test-method-and-requirements-phase-1-step-1>

Errington J. 2003. Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nat Rev Microbiol*. 1(2):117–126. doi:10.1038/nrmicro750.

Eschlbeck E, Seeburger C, Kulozik U. 2020. Spore inactivation on solid surfaces by vaporized hydrogen peroxide—Influence of carrier material surface properties. *Journal of Food Science*. 85(5):1536–1541. doi:10.1111/1750-3841.15086.

European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. 2021. The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. *EFS2*. 19(2). doi:10.2903/j.efsa.2021.6406. [accessed 2021 Sep 23].  
<https://data.europa.eu/doi/10.2903/j.efsa.2021.6406>.

Gopinath PM, Dhanasekaran D, Ranjani A, Thajuddin N, Akbarsha MA, Velmurugan M, Panneerselvam A. 2015. Optimization of sporicidal activity and environmental *Bacillus* endospores decontamination by biogenic silver nanoparticle. *Future Microbiology*. 10(5):725–741. doi:10.2217/fmb.14.150.

ISO 21871:2006. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the determination of low numbers of presumptive *Bacillus cereus* - Most probable number technique and detection method. [accessed 2021 Apr 28]  
<https://www.iso.org/standard/36015.html>

Khardori N, editor. 2006. Bioterrorism preparedness: medicine - public health - policy. Weinheim: Wiley-VCH.

Kothekar AT. 2020. Basic Principles of Disinfection and Sterilization in Intensive Care and Anesthesia and Their Applications during COVID-19 Pandemic. *Indian Journal of Critical Care Medicine*. 24(11):1114–1124. doi:10.5005/jp-journals-10071-23562.

Lemmer K, Pauli G, Howaldt S, Schwebke I, Mielke M, Grunow R. 2019. Decontamination of Personal Protective Equipment. *Health Security*. 17(3):200–212. doi:10.1089/hs.2019.0005.

Martinović T, Andjelković U, Gajdošik MŠ, Rešetar D, Josić D. 2016. Foodborne pathogens and their toxins. *Journal of Proteomics*. 147:226–235. doi:10.1016/j.jprot.2016.04.029.

Matz LL, Beaman TC, Gerhardt P. 1970. Chemical Composition of Exosporium from Spores of *Bacillus cereus*. *J Bacteriol*. 101(1):196–201. doi:10.1128/jb.101.1.196-201.1970.

McDonnell GE. 2017. Antisepsis, disinfection, and sterilization. Second edition. Washington, DC: ASM Press.

- Plomp M, Leighton TJ, Wheeler KE, Malkin AJ. 2005. The High-Resolution Architecture and Structural Dynamics of Bacillus Spores. *Biophysical Journal*. 88(1):603–608. doi:10.1529/biophysj.104.049312.
- Richter WR, Wood JP, Wendling MQS, Rogers JV. 2018. Inactivation of Bacillus anthracis spores to decontaminate subway railcar and related materials via the fogging of peracetic acid and hydrogen peroxide sporicidal liquids. *Journal of Environmental Management*. 206:800–806. doi:10.1016/j.jenvman.2017.11.027.
- Robertson JM, Anders DL, Basalyga F, Millar J, Slack DP, Bever R. 2018. Effect of Sterilants on Amplification and Detection of Target DNA from *Bacillus cereus* Spores. *J Forensic Sci*. 63(3):699–707. doi:10.1111/1556-4029.13653.
- Rutala WA, Weber DJ. 2013. Disinfection and sterilization: An overview. *American Journal of Infection Control*. 41(5):S2–S5. doi:10.1016/j.ajic.2012.11.005.
- Ryu C, Lee K, Yoo C, Seong WK, Oh H-B. 2003. Sensitive and Rapid Quantitative Detection of Anthrax Spores Isolated from Soil Samples by RealTime PCR. :7.
- Schatzmayr HG, Barth OM, Schatzmayr HG, Barth OM. 2013. Bioterrorism and pathogenic microorganisms. *História, Ciências, Saúde-Manguinhos*. 20(4):1735–1749. doi:10.1590/S0104-597020130005000016.
- Setlow P. 2014. Spore Resistance Properties. *Microbiol Spectr*. 2(5). doi:10.1128/microbiolspec.TBS-0003-2012.
- Silva MP, Pereira CA, Junqueira JC, Jorge AOC. 2013. Methods of destroying bacterial spores. :7.
- Waller LN, Fox N, Fox KF, Fox A, Price RL. 2004. Ruthenium red staining for ultrastructural visualization of a glycoprotein layer surrounding the spore of Bacillus anthracis and Bacillus subtilis. *Journal of Microbiological Methods*. 58(1):23–30. doi:10.1016/j.mimet.2004.02.012.
- Wawrzyk A, Rahnama M, Rybitwa D, Wieczorek K, Michalczewski G, Podsiadły E, Łobacz M. 2020. Decontamination of microbiologically contaminated abiotic porous surfaces in an oral surgery clinic using vaporised hydrogen peroxide (VHP). *J Environ Health Sci Engineer*. 18(2):639–653. doi:10.1007/s40201-020-00490-z.
- Willey JM, Sherwood L, Woolverton CJ. 2017. Prescott's microbiology. Tenth edition. New York, NY: McGraw-Hill.
- Wood JP, Adrion AC. 2019. Review of Decontamination Techniques for the Inactivation of *Bacillus anthracis* and Other Spore-Forming Bacteria Associated with Building or Outdoor Materials. *Environ Sci Technol*. 53(8):4045–4062. doi:10.1021/acs.est.8b05274.
- Wu M, Liang J, Tang J, Li G, Shan S, Guo Z, Deng L. 2017. Decontamination of multiple heavy metals-containing effluents through microbial biotechnology. *Journal of Hazardous Materials*. 337:189–197. doi:10.1016/j.jhazmat.2017.05.006.

## 9. ANEXOS

### 9.1. Anexo 1: Resultados da descontaminação dos esporos do topo de *B. cereus* NCTC 11143 com o peróxido de hidrogénio líquido a 10% e respetivo controlo positivo em superfícies limpas.

| Subpopulação de Esporos | Tempo exposição (min) | Número Placas | Diluições |       |       |       |       |     |     |    | ufc/ml   | Média total UFC/mL | Controlo Positivo UFC/mL |
|-------------------------|-----------------------|---------------|-----------|-------|-------|-------|-------|-----|-----|----|----------|--------------------|--------------------------|
|                         |                       |               | 0         | -1    | -2    | -3    | -4    | -5  | -6  | -7 |          |                    |                          |
| Topo                    | 30                    | 1ª            | 0         | 0     | 0     | 0     | 0     | 0   | 0   | 0  | 0        | 0                  | 1.16E+09                 |
|                         |                       | 2ª            | 0         | 0     | 0     | 0     | 0     | 0   | 0   | 0  | 0        |                    |                          |
|                         |                       | 3ª            | 0         | 0     | 0     | 0     | 0     | 0   | 0   | 0  | 0        |                    |                          |
|                         |                       | 4a            | 0         | 0     | 0     | 0     | 0     | 0   | 0   | 0  | 0        |                    |                          |
|                         |                       | 5a            | 0         | 0     | 0     | 0     | 0     | 0   | 0   | 0  | 0        |                    |                          |
|                         |                       | 6a            | 0         | 0     | 0     | 0     | 0     | 0   | 0   | 0  | 0        |                    |                          |
|                         | Controlo positivo     | 1a            | -----     | ----- | ----- | ----- | ----- | 320 | 65  | 5  | 6.50E+08 | 1.16E+09           |                          |
|                         |                       | 2a            | -----     | ----- | ----- | ----- | ----- | 808 | 108 | 3  | 1.08E+09 |                    |                          |
|                         |                       | 3ª            | -----     | ----- | ----- | ----- | ----- | 464 | 112 | 2  | 1.12E+09 |                    |                          |
|                         |                       | 4a            | -----     | ----- | ----- | ----- | ----- | 920 | 132 | 3  | 1.32E+09 |                    |                          |
|                         |                       | 5a            | -----     | ----- | ----- | ----- | ----- | 512 | 104 | 6  | 1.04E+09 |                    |                          |
|                         |                       | 6a            | -----     | ----- | ----- | ----- | ----- | 840 | 172 | 3  | 1.72E+09 |                    |                          |

| Número Placas | Redução Logarítmica | Redução logarítmica média | População Final (%) | Redução Logarítmica (%) | Média % | Desvio-Padrão (%) |
|---------------|---------------------|---------------------------|---------------------|-------------------------|---------|-------------------|
| 1ª            | 9.00                | 9.00                      | 0                   | 100                     | 100     | 0                 |
| 2ª            | 9.00                |                           | 0                   |                         |         |                   |
| 3ª            | 9.00                |                           | 0                   |                         |         |                   |
| 4a            | 9.00                |                           | 0                   |                         |         |                   |
| 5a            | 9.00                |                           | 0                   |                         |         |                   |
| 6a            | 9.00                |                           | 0                   |                         |         |                   |
| 1a            | 0.25                | 0.02                      | -----               |                         |         |                   |
| 2a            | 0.03                |                           |                     |                         |         |                   |
| 3ª            | 0.01                |                           |                     |                         |         |                   |
| 4a            | -0.06               |                           |                     |                         |         |                   |
| 5a            | 0.05                |                           |                     |                         |         |                   |
| 6a            | -0.17               |                           |                     |                         |         |                   |



**9.2. Anexo 2: Resultados da descontaminação dos esporos do fundo de *B. cereus* NCTC 11143 com o peróxido de hidrogénio líquido a 10% e respetivo controlo positivo em superfícies limpas.**

| Subpopulação de Esporos | Tempo exposição (min) | Número Placas | Diluições |       |       |       |       |     |    |    | ufc/ml   | Média total UFC/mL | Controlo Positivo UFC/mL |
|-------------------------|-----------------------|---------------|-----------|-------|-------|-------|-------|-----|----|----|----------|--------------------|--------------------------|
|                         |                       |               | 0         | -1    | -2    | -3    | -4    | -5  | -6 | -7 |          |                    |                          |
| Fundo                   | 30                    | 1ª            | 0         | 0     | 0     | 0     | 0     | 0   | 0  | 0  | 0        | 0                  | 3.55E+08                 |
|                         |                       | 2ª            | 0         | 0     | 0     | 0     | 0     | 0   | 0  | 0  | 0        |                    |                          |
|                         |                       | 3ª            | 0         | 0     | 0     | 0     | 0     | 0   | 0  | 0  | 0        |                    |                          |
|                         |                       | 4a            | 0         | 0     | 0     | 0     | 0     | 0   | 0  | 0  | 0        |                    |                          |
|                         |                       | 5a            | 0         | 0     | 0     | 0     | 0     | 0   | 0  | 0  | 0        |                    |                          |
|                         |                       | 6a            | 0         | 0     | 0     | 0     | 0     | 0   | 0  | 0  | 0        |                    |                          |
|                         | Controlo positivo     | 1a            | -----     | ----- | ----- | ----- | ----- | 300 | 31 | 5  | 3.10E+08 | 3.55E+08           |                          |
|                         |                       | 2a            | -----     | ----- | ----- | ----- | ----- | 240 | 30 | 9  | 3.00E+08 |                    |                          |
|                         |                       | 3ª            | -----     | ----- | ----- | ----- | ----- | 204 | 48 | 4  | 4.80E+08 |                    |                          |
|                         |                       | 4a            | -----     | ----- | ----- | ----- | ----- | 304 | 40 | 0  | 4.00E+08 |                    |                          |
|                         |                       | 5a            | -----     | ----- | ----- | ----- | ----- | 304 | 22 | 2  | 2.20E+08 |                    |                          |
|                         |                       | 6a            | -----     | ----- | ----- | ----- | ----- | 384 | 42 | 4  | 4.20E+08 |                    |                          |

| Número Placas | Redução Logarítmica | Redução logarítmica média | População Final (%) | Redução Logarítmica (%) | Média % | Desvio-Padrão (%) |
|---------------|---------------------|---------------------------|---------------------|-------------------------|---------|-------------------|
| 1ª            | 8.00                | 8.00                      | 0                   | 100                     | 100     | 0                 |
| 2ª            | 8.00                |                           | 0                   |                         |         |                   |
| 3ª            | 8.00                |                           | 0                   |                         |         |                   |
| 4a            | 8.00                |                           | 0                   |                         |         |                   |
| 5a            | 8.00                |                           | 0                   |                         |         |                   |
| 6a            | 8.00                |                           | 0                   |                         |         |                   |
| 1a            | 0.06                | 0.01                      | -----               |                         |         |                   |
| 2a            | 0.07                |                           |                     |                         |         |                   |
| 3ª            | -0.13               |                           |                     |                         |         |                   |
| 4a            | -0.05               |                           |                     |                         |         |                   |
| 5a            | 0.21                |                           |                     |                         |         |                   |
| 6a            | -0.07               |                           |                     |                         |         |                   |

**9.1. Anexo 4: Resultados da descontaminação dos esporos do fundo de *B. cereus* NCTC 11143 com o peróxido de hidrogénio líquido a 10% e respetivo controlo positivo em superfícies sujas com óleo alimentar.**

| Subpopulação de Esporos | Tempo exposição (min) | Número Placas | Diluições |      |      |      |      |     |    |    | ufc/ml   | Média total UFC/mL | Controlo Positivo UFC/mL |
|-------------------------|-----------------------|---------------|-----------|------|------|------|------|-----|----|----|----------|--------------------|--------------------------|
|                         |                       |               | 0         | -1   | -2   | -3   | -4   | -5  | -6 | -7 |          |                    |                          |
| Fundo                   | 30                    | 1ª            | 0         | 0    | 0    | 0    | 0    | 0   | 0  | 0  | 0        | 0                  | 2.30E+08                 |
|                         |                       | 2ª            | 0         | 0    | 0    | 0    | 0    | 0   | 0  | 0  | 0        |                    |                          |
|                         |                       | 3ª            | 0         | 0    | 0    | 0    | 0    | 0   | 0  | 0  | 0        |                    |                          |
|                         |                       | 4a            | 0         | 0    | 0    | 0    | 0    | 0   | 0  | 0  | 0        |                    |                          |
|                         |                       | 5a            | 0         | 0    | 0    | 0    | 0    | 0   | 0  | 0  | 0        |                    |                          |
|                         |                       | 6a            | 0         | 0    | 0    | 0    | 0    | 0   | 0  | 0  | 0        |                    |                          |
|                         | Controlo positivo     | 1a            | ----      | ---- | ---- | ---- | ---- | 248 | 27 | 3  | 2.70E+08 | 2.30E+08           |                          |
|                         |                       | 2a            | ----      | ---- | ---- | ---- | ---- | 220 | 30 | 8  | 3.00E+08 |                    |                          |
|                         |                       | 3ª            | ----      | ---- | ---- | ---- | ---- | 204 | 35 | 3  | 3.50E+08 |                    |                          |
|                         |                       | 4a            | ----      | ---- | ---- | ---- | ---- | 63  | 11 | 1  | 1.10E+08 |                    |                          |
|                         |                       | 5a            | ----      | ---- | ---- | ---- | ---- | 115 | 12 | 2  | 1.20E+08 |                    |                          |
|                         |                       | 6a            | ----      | ---- | ---- | ---- | ---- | 244 | 23 | 5  | 2.30E+08 |                    |                          |

| Número Placas | Redução Logarítmica | Redução logarítmica média | População Final (%) | Redução Logarítmica (%) | Média % | Desvio-Padrão (%) |
|---------------|---------------------|---------------------------|---------------------|-------------------------|---------|-------------------|
| 1ª            | 8.00                | 8.00                      | 0                   | 100                     | 100     | 0                 |
| 2ª            | 8.00                |                           | 0                   |                         |         |                   |
| 3ª            | 8.00                |                           | 0                   |                         |         |                   |
| 4a            | 8.00                |                           | 0                   |                         |         |                   |
| 5a            | 8.00                |                           | 0                   |                         |         |                   |
| 6a            | 8.00                |                           | 0                   |                         |         |                   |
| 1a            | -0.07               | 0.04                      | -----               |                         |         |                   |
| 2a            | -0.12               |                           |                     |                         |         |                   |
| 3ª            | -0.18               |                           |                     |                         |         |                   |
| 4a            | 0.32                |                           |                     |                         |         |                   |
| 5a            | 0.28                |                           |                     |                         |         |                   |
| 6a            | 0.00                |                           |                     |                         |         |                   |

**9.2. Anexo 3: Resultados da descontaminação dos esporos do topo de *B. cereus* NCTC 11143 com o peróxido de hidrogénio líquido a 10% e respetivo controlo positivo em superfícies sujas com óleo alimentar.**

| Tempo exposição (min) | Número Placas | Diluições |       |       |       |       |     |     |    | ufc/ml   | Média total UFC/mL | Controlo Positivo UFC/mL |
|-----------------------|---------------|-----------|-------|-------|-------|-------|-----|-----|----|----------|--------------------|--------------------------|
|                       |               | 0         | -1    | -2    | -3    | -4    | -5  | -6  | -7 |          |                    |                          |
| 30                    | 1ª            | 0         | 0     | 0     | 0     | 0     | 0   | 0   | 0  | 0        | 0                  | 1.11E+09                 |
|                       | 2ª            | 0         | 0     | 0     | 0     | 0     | 0   | 0   | 0  | 0        |                    |                          |
|                       | 3ª            | 0         | 0     | 0     | 0     | 0     | 0   | 0   | 0  | 0        |                    |                          |
|                       | 4a            | 0         | 0     | 0     | 0     | 0     | 0   | 0   | 0  | 0        |                    |                          |
|                       | 5a            | 0         | 0     | 0     | 0     | 0     | 0   | 0   | 0  | 0        |                    |                          |
|                       | 6a            | 0         | 0     | 0     | 0     | 0     | 0   | 0   | 0  | 0        |                    |                          |
| Controlo positivo     | 1a            | -----     | ----- | ----- | ----- | ----- | 300 | 96  | 7  | 9.60E+08 | 1.11E+09           |                          |
|                       | 2a            | -----     | ----- | ----- | ----- | ----- | 240 | 91  | 15 | 9.10E+08 |                    |                          |
|                       | 3ª            | -----     | ----- | ----- | ----- | ----- | 204 | 148 | 50 | 1.48E+09 |                    |                          |
|                       | 4a            | -----     | ----- | ----- | ----- | ----- | 304 | 128 | 16 | 1.28E+09 |                    |                          |
|                       | 5a            | -----     | ----- | ----- | ----- | ----- | 304 | 82  | 15 | 8.20E+08 |                    |                          |
|                       | 6a            | -----     | ----- | ----- | ----- | ----- | 384 | 120 | 9  | 1.20E+09 |                    |                          |

| Número Placas | Redução Logarítmica | Redução logarítmica média | População Final (%) | Redução Logarítmica (%) | Média % | Desvio-Padrão (%) |
|---------------|---------------------|---------------------------|---------------------|-------------------------|---------|-------------------|
| 1ª            | 9.00                | 9.00                      | 0                   | 100                     | 100     | 0                 |
| 2ª            | 9.00                |                           | 0                   |                         |         |                   |
| 3ª            | 9.00                |                           | 0                   |                         |         |                   |
| 4a            | 9.00                |                           | 0                   |                         |         |                   |
| 5a            | 9.00                |                           | 0                   |                         |         |                   |
| 6a            | 9.00                |                           | 0                   |                         |         |                   |
| 1a            | 0.06                | 0.01                      | -----               |                         |         |                   |
| 2a            | 0.09                |                           |                     |                         |         |                   |
| 3ª            | -0.13               |                           |                     |                         |         |                   |
| 4a            | -0.06               |                           |                     |                         |         |                   |
| 5a            | 0.13                |                           |                     |                         |         |                   |
| 6a            | -0.03               |                           |                     |                         |         |                   |

**9.3. Anexo 5: Resultados da descontaminação dos esporos do topo de *B. cereus* NCTC 11143 com o ácido peracético líquido a 0.1% (controlo padrão) e respetivo controlo positivo em superfícies limpas.**

| Subpopulação de Esporos | Tempo exposição (min) | Número Placas | Diluições |       |       |       |       |     |     |    | ufo/ml   | Média total UFC/mL | Controlo Positivo UFC/mL |
|-------------------------|-----------------------|---------------|-----------|-------|-------|-------|-------|-----|-----|----|----------|--------------------|--------------------------|
|                         |                       |               | 0         | -1    | -2    | -3    | -4    | -5  | -6  | -7 |          |                    |                          |
| Topo                    | 30                    | 1ª            | 0         | 0     | 0     | 0     | 0     | 0   | 0   | 0  | 0        | 0                  | 1.16E+09                 |
|                         |                       | 2ª            | 0         | 0     | 0     | 0     | 0     | 0   | 0   | 0  | 0        |                    |                          |
|                         |                       | 3ª            | 0         | 0     | 0     | 0     | 0     | 0   | 0   | 0  | 0        |                    |                          |
|                         |                       | 4ª            | 0         | 0     | 0     | 0     | 0     | 0   | 0   | 0  | 0        |                    |                          |
|                         |                       | 5ª            | 0         | 0     | 0     | 0     | 0     | 0   | 0   | 0  | 0        |                    |                          |
|                         |                       | 6ª            | 0         | 0     | 0     | 0     | 0     | 0   | 0   | 0  | 0        |                    |                          |
|                         | Controlo positivo     | 1ª            | -----     | ----- | ----- | ----- | ----- | 320 | 65  | 5  | 6.50E+08 | 1.16E+09           |                          |
|                         |                       | 2ª            | -----     | ----- | ----- | ----- | ----- | 808 | 108 | 3  | 1.08E+09 |                    |                          |
|                         |                       | 3ª            | -----     | ----- | ----- | ----- | ----- | 464 | 112 | 2  | 1.12E+09 |                    |                          |
|                         |                       | 4ª            | -----     | ----- | ----- | ----- | ----- | 920 | 132 | 3  | 1.32E+09 |                    |                          |
|                         |                       | 5ª            | -----     | ----- | ----- | ----- | ----- | 512 | 104 | 6  | 1.04E+09 |                    |                          |
|                         |                       | 6ª            | -----     | ----- | ----- | ----- | ----- | 840 | 172 | 3  | 1.72E+09 |                    |                          |

| Número Placas | Redução Logarítmica | Redução logarítmica média | População Final (%) | Redução Logarítmica (%) | Média % | Desvio-Padrão (%) |
|---------------|---------------------|---------------------------|---------------------|-------------------------|---------|-------------------|
| 1ª            | 9.00                | 9.00                      | 0                   | 100                     | 100     | 0                 |
| 2ª            | 9.00                |                           | 0                   |                         |         |                   |
| 3ª            | 9.00                |                           | 0                   |                         |         |                   |
| 4a            | 9.00                |                           | 0                   |                         |         |                   |
| 5a            | 9.00                |                           | 0                   |                         |         |                   |
| 6a            | 9.00                |                           | 0                   |                         |         |                   |
| 1a            | 0.25                | 0.02                      | -----               |                         |         |                   |
| 2a            | 0.03                |                           |                     |                         |         |                   |
| 3ª            | 0.01                |                           |                     |                         |         |                   |
| 4a            | -0.06               |                           |                     |                         |         |                   |
| 5a            | 0.05                |                           |                     |                         |         |                   |
| 6a            | -0.17               |                           |                     |                         |         |                   |

**9.4. Anexo 6: Resultados da descontaminação dos esporos do fundo de *B. cereus* NCTC 11143 com o ácido peracético líquido a 0.1% (controlo padrão), e respetivo controlo positivo em superfícies limpas.**

| Subpopulação de Esporos | Tempo exposição (min) | Número Placas | Diluições |      |      |      |      |     |    |    | ufc/ml   | Média total UFC/mL | Controlo Positivo UFC/mL |
|-------------------------|-----------------------|---------------|-----------|------|------|------|------|-----|----|----|----------|--------------------|--------------------------|
|                         |                       |               | 0         | -1   | -2   | -3   | -4   | -5  | -6 | -7 |          |                    |                          |
| Fundo                   | 30                    | 1ª            | 0         | 0    | 0    | 0    | 0    | 0   | 0  | 0  | 0        | 0                  | 3.55E+08                 |
|                         |                       | 2ª            | 0         | 0    | 0    | 0    | 0    | 0   | 0  | 0  | 0        |                    |                          |
|                         |                       | 3ª            | 0         | 0    | 0    | 0    | 0    | 0   | 0  | 0  | 0        |                    |                          |
|                         |                       | 4a            | 0         | 0    | 0    | 0    | 0    | 0   | 0  | 0  | 0        |                    |                          |
|                         |                       | 5a            | 0         | 0    | 0    | 0    | 0    | 0   | 0  | 0  | 0        |                    |                          |
|                         |                       | 6a            | 0         | 0    | 0    | 0    | 0    | 0   | 0  | 0  | 0        |                    |                          |
|                         | Controlo positivo     | 1a            | ----      | ---- | ---- | ---- | ---- | 300 | 31 | 5  | 3.10E+08 | 3.55E+08           |                          |
|                         |                       | 2a            | ----      | ---- | ---- | ---- | ---- | 240 | 30 | 9  | 3.00E+08 |                    |                          |
|                         |                       | 3ª            | ----      | ---- | ---- | ---- | ---- | 204 | 48 | 4  | 4.80E+08 |                    |                          |
|                         |                       | 4a            | ----      | ---- | ---- | ---- | ---- | 304 | 40 | 0  | 4.00E+08 |                    |                          |
|                         |                       | 5a            | ----      | ---- | ---- | ---- | ---- | 304 | 22 | 2  | 2.20E+08 |                    |                          |
|                         |                       | 6a            | ----      | ---- | ---- | ---- | ---- | 384 | 42 | 4  | 4.20E+08 |                    |                          |

| Número Placas | Redução Logarítmica | Redução logarítmica média | População Final (%) | Redução Logarítmica (%) | Média % | Desvio-Padrão (%) |
|---------------|---------------------|---------------------------|---------------------|-------------------------|---------|-------------------|
| 1ª            | 8.00                | 8.00                      | 0                   | 100                     | 100     | 0                 |
| 2ª            | 8.00                |                           | 0                   |                         |         |                   |
| 3ª            | 8.00                |                           | 0                   |                         |         |                   |
| 4a            | 8.00                |                           | 0                   |                         |         |                   |
| 5a            | 8.00                |                           | 0                   |                         |         |                   |
| 6a            | 8.00                |                           | 0                   |                         |         |                   |
| 1a            | 0.06                | 0.01                      | -----               |                         |         |                   |
| 2a            | 0.07                |                           |                     |                         |         |                   |
| 3ª            | -0.13               |                           |                     |                         |         |                   |
| 4a            | -0.05               |                           |                     |                         |         |                   |
| 5a            | 0.21                |                           |                     |                         |         |                   |
| 6a            | -0.07               |                           |                     |                         |         |                   |

**9.5. Anexo 7: Resultados da descontaminação dos esporos do topo de *B. cereus* NCTC 11143 com o ácido peracético líquido a 0.1% (controlo padrão), e respetivo controlo positivo em superfícies sujas com óleo alimentar.**

| Tempo exposição (min) | Número Placas | Diluições |       |       |       |       |     |     |    | ufo/ml   | Média total UFC/mL | Controlo Positivo UFC/mL |
|-----------------------|---------------|-----------|-------|-------|-------|-------|-----|-----|----|----------|--------------------|--------------------------|
|                       |               | 0         | -1    | -2    | -3    | -4    | -5  | -6  | -7 |          |                    |                          |
| 30                    | 1ª            | 0         | 0     | 0     | 0     | 0     | 0   | 0   | 0  | 0        | 0                  | 1.11E+09                 |
|                       | 2ª            | 0         | 0     | 0     | 0     | 0     | 0   | 0   | 0  | 0        |                    |                          |
|                       | 3ª            | 0         | 0     | 0     | 0     | 0     | 0   | 0   | 0  | 0        |                    |                          |
|                       | 4a            | 0         | 0     | 0     | 0     | 0     | 0   | 0   | 0  | 0        |                    |                          |
|                       | 5a            | 0         | 0     | 0     | 0     | 0     | 0   | 0   | 0  | 0        |                    |                          |
|                       | 6a            | 0         | 0     | 0     | 0     | 0     | 0   | 0   | 0  | 0        |                    |                          |
| Controlo positivo     | 1a            | -----     | ----- | ----- | ----- | ----- | 300 | 96  | 7  | 9.60E+08 | 1.11E+09           |                          |
|                       | 2a            | -----     | ----- | ----- | ----- | ----- | 240 | 91  | 15 | 9.10E+08 |                    |                          |
|                       | 3ª            | -----     | ----- | ----- | ----- | ----- | 204 | 148 | 50 | 1.48E+09 |                    |                          |
|                       | 4a            | -----     | ----- | ----- | ----- | ----- | 304 | 128 | 16 | 1.28E+09 |                    |                          |
|                       | 5a            | -----     | ----- | ----- | ----- | ----- | 304 | 82  | 15 | 8.20E+08 |                    |                          |
|                       | 6a            | -----     | ----- | ----- | ----- | ----- | 384 | 120 | 9  | 1.20E+09 |                    |                          |

| Número Placas | Redução Logarítmica | Redução logarítmica média | População Final (%) | Redução Logarítmica (%) | Média % | Desvio-Padrão (%) |
|---------------|---------------------|---------------------------|---------------------|-------------------------|---------|-------------------|
| 1ª            | 9.00                | 9.00                      | 0                   | 100                     | 100     | 0                 |
| 2ª            | 9.00                |                           | 0                   |                         |         |                   |
| 3ª            | 9.00                |                           | 0                   |                         |         |                   |
| 4a            | 9.00                |                           | 0                   |                         |         |                   |
| 5a            | 9.00                |                           | 0                   |                         |         |                   |
| 6a            | 9.00                |                           | 0                   |                         |         |                   |
| 1a            | 0.06                | 0.01                      | -----               |                         |         |                   |
| 2a            | 0.09                |                           |                     |                         |         |                   |
| 3ª            | -0.13               |                           |                     |                         |         |                   |
| 4a            | -0.06               |                           |                     |                         |         |                   |
| 5a            | 0.13                |                           |                     |                         |         |                   |
| 6a            | -0.03               |                           |                     |                         |         |                   |

**9.6. Anexo 8: Resultados da descontaminação dos esporos do fundo de *B. cereus* NCTC 11143 com o ácido peracético líquido a 0.1% (controlo padrão), e respetivo controlo positivo em superfícies sujas com óleo alimentar.**

| Subpopulação de Esporos | Tempo exposição (min) | Número Placas | Diluições |      |      |      |      |     |    |    | ufc/ml   | Média total UFC/mL | Controlo Positivo UFC/mL |
|-------------------------|-----------------------|---------------|-----------|------|------|------|------|-----|----|----|----------|--------------------|--------------------------|
|                         |                       |               | 0         | -1   | -2   | -3   | -4   | -5  | -6 | -7 |          |                    |                          |
| Fundo                   | 30                    | 1ª            | 0         | 0    | 0    | 0    | 0    | 0   | 0  | 0  | 0        | 0                  | 2.30E+08                 |
|                         |                       | 2ª            | 0         | 0    | 0    | 0    | 0    | 0   | 0  | 0  | 0        |                    |                          |
|                         |                       | 3ª            | 0         | 0    | 0    | 0    | 0    | 0   | 0  | 0  | 0        |                    |                          |
|                         |                       | 4a            | 0         | 0    | 0    | 0    | 0    | 0   | 0  | 0  | 0        |                    |                          |
|                         |                       | 5a            | 0         | 0    | 0    | 0    | 0    | 0   | 0  | 0  | 0        |                    |                          |
|                         |                       | 6a            | 0         | 0    | 0    | 0    | 0    | 0   | 0  | 0  | 0        |                    |                          |
|                         | Controlo positivo     | 1a            | ----      | ---- | ---- | ---- | ---- | 248 | 27 | 3  | 2.70E+08 | 2.30E+08           |                          |
|                         |                       | 2a            | ----      | ---- | ---- | ---- | ---- | 220 | 30 | 8  | 3.00E+08 |                    |                          |
|                         |                       | 3ª            | ----      | ---- | ---- | ---- | ---- | 204 | 35 | 3  | 3.50E+08 |                    |                          |
|                         |                       | 4a            | ----      | ---- | ---- | ---- | ---- | 63  | 11 | 1  | 1.10E+08 |                    |                          |
|                         |                       | 5a            | ----      | ---- | ---- | ---- | ---- | 115 | 12 | 2  | 1.20E+08 |                    |                          |
|                         |                       | 6a            | ----      | ---- | ---- | ---- | ---- | 244 | 23 | 5  | 2.30E+08 |                    |                          |

| Número Placas | Redução Logarítmica | Redução logarítmica média | População Final (%) | Redução Logarítmica (%) | Média % | Desvio-Padrão (%) |
|---------------|---------------------|---------------------------|---------------------|-------------------------|---------|-------------------|
| 1ª            | 8.00                | 8.00                      | 0                   | 100                     | 100     | 0                 |
| 2ª            | 8.00                |                           | 0                   |                         |         |                   |
| 3ª            | 8.00                |                           | 0                   |                         |         |                   |
| 4a            | 8.00                |                           | 0                   |                         |         |                   |
| 5a            | 8.00                |                           | 0                   |                         |         |                   |
| 6a            | 8.00                |                           | 0                   |                         |         |                   |
| 1a            | -0.07               | 0.04                      | -----               |                         |         |                   |
| 2a            | -0.12               |                           |                     |                         |         |                   |
| 3ª            | -0.18               |                           |                     |                         |         |                   |
| 4a            | 0.32                |                           |                     |                         |         |                   |
| 5a            | 0.28                |                           |                     |                         |         |                   |
| 6a            | 0.00                |                           |                     |                         |         |                   |

**9.7. Anexo 9: Resultados da descontaminação dos esporos do topo de *B. cereus* NCTC 11143 com dryVHP e respetivo controlo positivo, em superfícies limpas.**

| Subpopulação de Esporos | Tempo exposição (min)     | Número Placas | Diluições  |            |            |            |            |     |     |       | ufc/ml   | Média total UFC/mL | Controlo Positivo UFC/mL |
|-------------------------|---------------------------|---------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|-----|-------|----------|--------------------|--------------------------|
|                         |                           |               | 0          | -1         | -2         | -3         | -4         | -5  | -6  | -7    |          |                    |                          |
| Topo                    | 30 (heat and ventilation) | 1ª            | incontável | incontável | incontável | incontável | 632        | 136 | 11  | ----- | 1.36E+08 | 1.77E+08           | 1.16E+09                 |
|                         |                           | 2ª            | incontável | incontável | incontável | incontável | 800        | 164 | 19  | ----- | 1.64E+08 |                    |                          |
|                         |                           | 3ª            | incontável | incontável | incontável | incontável | 1120       | 216 | 19  | ----- | 2.16E+08 |                    |                          |
|                         |                           | 4a            | incontável | incontável | incontável | incontável | incontável | 212 | 36  | ----- | 2.12E+08 |                    |                          |
|                         |                           | 5a            | incontável | incontável | incontável | incontável | incontável | 240 | 39  | ----- | 2.40E+08 |                    |                          |
|                         |                           | 6a            | incontável | incontável | incontável | incontável | 432        | 92  | 7   | ----- | 9.20E+07 |                    |                          |
|                         | Controlo positivo         | 1a            | -----      | -----      | -----      | -----      | -----      | 320 | 65  | 5     | 6.50E+08 | 1.16E+09           |                          |
|                         |                           | 2a            | -----      | -----      | -----      | -----      | -----      | 808 | 108 | 3     | 1.08E+09 |                    |                          |
|                         |                           | 3ª            | -----      | -----      | -----      | -----      | -----      | 464 | 112 | 2     | 1.12E+09 |                    |                          |
|                         |                           | 4a            | -----      | -----      | -----      | -----      | -----      | 920 | 132 | 3     | 1.32E+09 |                    |                          |
|                         |                           | 5a            | -----      | -----      | -----      | -----      | -----      | 512 | 104 | 6     | 1.04E+09 |                    |                          |
|                         |                           | 6a            | -----      | -----      | -----      | -----      | -----      | 840 | 172 | 3     | 1.72E+09 |                    |                          |

| Número Placas | Redução Logarítmica | Redução logarítmica média | População Final (%) | Redução Logarítmica (%) | Redução Log. Média % | Desvio-Padrão (%) |
|---------------|---------------------|---------------------------|---------------------|-------------------------|----------------------|-------------------|
| 1ª            | 0.93                | 0.84                      | 11.72               | 88.276                  | 84.77                | 4.84              |
| 2ª            | 0.85                |                           | 14.14               | 85.862                  |                      |                   |
| 3ª            | 0.73                |                           | 18.62               | 81.379                  |                      |                   |
| 4a            | 0.74                |                           | 18.28               | 81.724                  |                      |                   |
| 5a            | 0.68                |                           | 20.69               | 79.310                  |                      |                   |
| 6a            | 1.10                |                           | 7.93                | 92.069                  |                      |                   |
| 1a            | 0.25                | 0.02                      |                     |                         |                      |                   |
| 2a            | 0.03                |                           |                     |                         |                      |                   |
| 3ª            | 0.01                |                           |                     |                         |                      |                   |
| 4a            | -0.06               |                           |                     |                         |                      |                   |
| 5a            | 0.05                |                           |                     |                         |                      |                   |
| 6a            | -0.17               |                           |                     |                         |                      |                   |



**9.8. Anexo 10: Resultados da descontaminação dos esporos do fundo de *B. cereus* NCTC 11143 com dryVHP e respetivo controlo positivo, em superfícies limpas.**

| Subpopulação de Esporos | Tempo exposição (min)     | Número Placas | Diluições |      |      |      |      |     |    |      | ufc/ml   | Média total UFC/mL | Controlo Positivo UFC/mL |
|-------------------------|---------------------------|---------------|-----------|------|------|------|------|-----|----|------|----------|--------------------|--------------------------|
|                         |                           |               |           |      |      |      |      |     |    | -7   |          |                    |                          |
| Fundo                   | 30 (heat and ventilation) | 1ª            | ----      | 172  | 23   | 9    | 0    | 0   | 0  | ---- | 2.30E+04 | 1.72E+04           | 3.55E+08                 |
|                         |                           | 2ª            | ----      | 77   | 13   | 1    | 0    | 0   | 0  | ---- | 1.30E+04 |                    |                          |
|                         |                           | 3ª            | ----      | 144  | 22   | 2    | 0    | 0   | 0  | ---- | 2.20E+04 |                    |                          |
|                         |                           | 4a            | ----      | 124  | 10   | 1    | 0    | 0   | 0  | ---- | 1.00E+04 |                    |                          |
|                         |                           | 5a            | ----      | 98   | 12   | 1    | 0    | 0   | 0  | ---- | 1.20E+04 |                    |                          |
|                         |                           | 6a            | ----      | 172  | 23   | 5    | 0    | 0   | 0  | ---- | 2.30E+04 |                    |                          |
|                         | Controlo positivo         | 1a            | ----      | ---- | ---- | ---- | ---- | 300 | 31 | 5    | 3.10E+08 | 3.55E+08           |                          |
|                         |                           | 2a            | ----      | ---- | ---- | ---- | ---- | 240 | 30 | 9    | 3.00E+08 |                    |                          |
|                         |                           | 3ª            | ----      | ---- | ---- | ---- | ---- | 204 | 48 | 4    | 4.80E+08 |                    |                          |
|                         |                           | 4a            | ----      | ---- | ---- | ---- | ---- | 304 | 40 | 0    | 4.00E+08 |                    |                          |
|                         |                           | 5a            | ----      | ---- | ---- | ---- | ---- | 304 | 22 | 2    | 2.20E+08 |                    |                          |
|                         |                           | 6a            | ----      | ---- | ---- | ---- | ---- | 384 | 42 | 4    | 4.20E+08 |                    |                          |

| Número Placas | Redução Logarítmica | Redução logarítmica média | População Final (%) | Redução Logarítmica (%) | Redução Log. Média % | Desvio-Padrão (%) |
|---------------|---------------------|---------------------------|---------------------|-------------------------|----------------------|-------------------|
| 1ª            | 4.19                | 4.34                      | 0.006               | 99.994                  | 99.995               | 0.002             |
| 2ª            | 4.44                |                           | 0.004               | 99.996                  |                      |                   |
| 3ª            | 4.21                |                           | 0.006               | 99.994                  |                      |                   |
| 4a            | 4.55                |                           | 0.003               | 99.997                  |                      |                   |
| 5a            | 4.47                |                           | 0.003               | 99.997                  |                      |                   |
| 6a            | 4.19                |                           | 0.006               | 99.994                  |                      |                   |
| 1a            | 0.06                | 0.01                      |                     |                         |                      |                   |
| 2a            | 0.07                |                           |                     |                         |                      |                   |
| 3ª            | -0.13               |                           |                     |                         |                      |                   |
| 4a            | -0.05               |                           |                     |                         |                      |                   |
| 5a            | 0.21                |                           |                     |                         |                      |                   |
| 6a            | -0.07               |                           |                     |                         |                      |                   |

**9.9. Anexo 11: Resultados da descontaminação dos esporos do topo de *B. cereus* NCTC 11143 com dryVHP e respetivo controlo positivo, em superfícies sujas com óleo alimentar.**

| Subpopulação de Esporos | Tempo exposição (min)     | Número Placas | Diluições |            |            |            |            |      |     |       | ufc/ml   | Média total UFC/mL | Controlo Positivo UFC/mL |
|-------------------------|---------------------------|---------------|-----------|------------|------------|------------|------------|------|-----|-------|----------|--------------------|--------------------------|
|                         |                           |               | 0         | -1         | -2         | -3         | -4         | -5   | -6  | -7    |          |                    |                          |
| Topo                    | 30 (heat and ventilation) | 1#            | -----     | incontável | incontável | incontável | incontável | 552  | 59  | ----- | 5.90E+08 | 3.77E+08           | 1.11E+09                 |
|                         |                           | 2#            | -----     | incontável | incontável | incontável | incontável | 296  | 26  | ----- | 2.60E+08 |                    |                          |
|                         |                           | 3#            | -----     | incontável | incontável | incontável | incontável | 672  | 38  | ----- | 3.80E+08 |                    |                          |
|                         |                           | 4a            | -----     | incontável | incontável | incontável | incontável | 712  | 67  | ----- | 6.70E+08 |                    |                          |
|                         |                           | 5a            | -----     | incontável | incontável | incontável | incontável | 284  | 22  | ----- | 2.20E+08 |                    |                          |
|                         |                           | 6a            | -----     | incontável | incontável | incontável | incontável | 1072 | 96  | ----- | 1.40E+08 |                    |                          |
|                         | Controlo positivo         | 1a            | -----     | -----      | -----      | -----      | -----      | 300  | 96  | 7     | 9.60E+08 | 1.11E+09           |                          |
|                         |                           | 2a            | -----     | -----      | -----      | -----      | -----      | 240  | 91  | 15    | 9.10E+08 |                    |                          |
|                         |                           | 3#            | -----     | -----      | -----      | -----      | -----      | 204  | 148 | 50    | 1.48E+09 |                    |                          |
|                         |                           | 4a            | -----     | -----      | -----      | -----      | -----      | 304  | 128 | 16    | 1.28E+09 |                    |                          |
|                         |                           | 5a            | -----     | -----      | -----      | -----      | -----      | 304  | 82  | 15    | 8.20E+08 |                    |                          |
|                         |                           | 6a            | -----     | -----      | -----      | -----      | -----      | 384  | 120 | 9     | 1.20E+09 |                    |                          |

| Número Placas | Redução Logaritmica | Redução logaritmica média | População Final (%) | Redução Logaritmica (%) | Redução Log. Média % | Desvio-Padrão (%) |
|---------------|---------------------|---------------------------|---------------------|-------------------------|----------------------|-------------------|
| 1#            | 0.27                | 0.53                      | 53.15               | 46.85                   | 66.07                | 19.142            |
| 2#            | 0.63                |                           | 23.42               | 76.58                   |                      |                   |
| 3#            | 0.47                |                           | 34.23               | 65.77                   |                      |                   |
| 4a            | 0.22                |                           | 60.36               | 39.64                   |                      |                   |
| 5a            | 0.70                |                           | 19.82               | 80.18                   |                      |                   |
| 6a            | 0.90                |                           | 12.61               | 87.39                   |                      |                   |
| 1a            | 0.06                | 0.01                      |                     |                         |                      |                   |
| 2a            | 0.09                |                           |                     |                         |                      |                   |
| 3#            | -0.13               |                           |                     |                         |                      |                   |
| 4a            | -0.06               |                           |                     |                         |                      |                   |
| 5a            | 0.13                |                           |                     |                         |                      |                   |
| 6a            | -0.03               |                           |                     |                         |                      |                   |

**9.10. Anexo 12: Resultados da descontaminação dos esporos do fundo de *B. cereus* NCTC 11143 com dryVHP e respetivo controlo positivo, em superfícies sujas com óleo alimentar.**

| Subpopulação de Esporos | Tempo exposição (min)     | Número Placas | Diluições |      |      |      |      |     |    |      | ufc/ml   | Média total UFC/mL | Controlo Positivo UFC/mL |
|-------------------------|---------------------------|---------------|-----------|------|------|------|------|-----|----|------|----------|--------------------|--------------------------|
|                         |                           |               | 0         | -1   | -2   | -3   | -4   | -5  | -6 | -7   |          |                    |                          |
| Fundo                   | 30 (heat and ventilation) | 1#            | ----      | 114  | 18   | 1    | 0    | 0   | 0  | ---- | 1.80E+04 | 3.33E+04           | 2.30E+08                 |
|                         |                           | 2#            | ----      | 164  | 25   | 4    | 0    | 0   | 0  | ---- | 2.50E+04 |                    |                          |
|                         |                           | 3#            | ----      | 204  | 31   | 3    | 0    | 0   | 0  | ---- | 3.10E+04 |                    |                          |
|                         |                           | 4a            | ----      | 184  | 42   | 5    | 0    | 0   | 0  | ---- | 4.20E+04 |                    |                          |
|                         |                           | 5a            | ----      | 152  | 28   | 8    | 0    | 0   | 0  | ---- | 2.80E+04 |                    |                          |
|                         |                           | 6a            | ----      | 280  | 56   | 4    | 0    | 0   | 0  | ---- | 5.60E+04 |                    |                          |
|                         | Controlo positivo         | 1a            | ----      | ---- | ---- | ---- | ---- | 248 | 27 | 3    | 2.70E+08 | 2.30E+08           |                          |
|                         |                           | 2a            | ----      | ---- | ---- | ---- | ---- | 220 | 30 | 8    | 3.00E+08 |                    |                          |
|                         |                           | 3#            | ----      | ---- | ---- | ---- | ---- | 204 | 35 | 3    | 3.50E+08 |                    |                          |
|                         |                           | 4a            | ----      | ---- | ---- | ---- | ---- | 63  | 11 | 1    | 1.10E+08 |                    |                          |
|                         |                           | 5a            | ----      | ---- | ---- | ---- | ---- | 115 | 12 | 2    | 1.20E+08 |                    |                          |
|                         |                           | 6a            | ----      | ---- | ---- | ---- | ---- | 244 | 23 | 5    | 2.30E+08 |                    |                          |

| Número Placas | Redução Logaritmica | Redução logaritmica média | População Final (%) | Redução Logaritmica (%) | Redução Log. Média % | Desvio-Padrão (%) |
|---------------|---------------------|---------------------------|---------------------|-------------------------|----------------------|-------------------|
| 1ª            | 4.11                | 3.87                      | 0.008               | 99.99                   | 99.99                | 0.006             |
| 2ª            | 3.96                |                           | 0.011               | 99.99                   |                      |                   |
| 3ª            | 3.87                |                           | 0.013               | 99.99                   |                      |                   |
| 4a            | 3.74                |                           | 0.018               | 99.98                   |                      |                   |
| 5a            | 3.91                |                           | 0.012               | 99.99                   |                      |                   |
| 6a            | 3.61                |                           | 0.024               | 99.98                   |                      |                   |
| 1a            | -0.07               | 0.04                      |                     |                         |                      |                   |
| 2a            | -0.12               |                           |                     |                         |                      |                   |
| 3ª            | -0.18               |                           |                     |                         |                      |                   |
| 4a            | 0.32                |                           |                     |                         |                      |                   |
| 5a            | 0.28                |                           |                     |                         |                      |                   |
| 6a            | 0.00                |                           |                     |                         |                      |                   |

**9.11. Anexo 13: Resultados da descontaminação do controlo negativo em superfícies limpas**

|           | Diluição 1 | Diluição 2 | Diluição 3 | Diluição 4 | Diluição 5 | Diluição 6 | Diluição 7 | nº ufc/ml |
|-----------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----------|
| Amostra 1 | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0         |
| Amostra 2 | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0         |
| Amostra 3 | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0         |
| Média     |            |            |            |            |            |            |            | 0         |

**9.12. Anexo 14: Resultados da descontaminação do controlo negativo em superfícies sujas com óleo alimentar**

|              | Diluição 1 | Diluição 2 | Diluição 3 | Diluição 4 | Diluição 5 | Diluição 6 | Diluição 7 | nº ufc/ml |
|--------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----------|
| Amostra 1    | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0         |
| Amostra 2    | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0         |
| Amostra 3    | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          | 0         |
| <b>Média</b> |            |            |            |            |            |            |            | <b>0</b>  |

**9.13. Anexo 15: Análise estatística dos esporos do topo de *B. cereus* NCTC 11143 após descontaminação por dryVHP em SL e SS.**

| dryVHP, esporos do topo (% Redução) |                                     |                |
|-------------------------------------|-------------------------------------|----------------|
| Tabela Analizada                    | Coluna B                            | H202 Gasoso SS |
|                                     | <i>versus</i>                       | <i>versus</i>  |
|                                     | Coluna A                            | H202 Gasoso SL |
| Teste de <i>Mann Whitney</i>        | Valor de P                          | <b>0.0411</b>  |
|                                     | Valor de P é exato ou aproximado?   | Exato          |
|                                     | Diferença Significativa (P < 0.05)? | <b>Sim</b>     |
|                                     | Soma das fileiras nas colunas A, B  | 52, 26         |
|                                     | <i>Mann-Whitney U</i>               | 5              |
|                                     | Média da coluna A                   | 83.79, n=6     |
| Diferenças entre as médias          | Média da coluna B                   | 71.18, n=6     |
|                                     | Diferença: Atual                    | -12.62         |
|                                     | Diferença: <i>Hodges-Lehmann</i>    | -14.51         |

**9.14. Anexo 16: Análise estatística dos esporos do fundo de *B. cereus* NCTC 11143 após descontaminação por dryVHP em SL e SS.**

| dryVHP, esporos do fundo (% Redução) |   |                |
|--------------------------------------|---|----------------|
| Tabela Analizada                     | Coluna B                                | H202 Gasoso SS |
|                                      | <i>versus</i>                           | <i>versus</i>  |
|                                      | Coluna A                                | H202 Gasoso SL |
| Teste de <i>Mann-Whitney</i>         | Valor de P                              | <b>0.0022</b>  |
|                                      | Valor de P é exato ou aproximado?       | Exato          |
|                                      | Diferença Significativa ( $P < 0.05$ )? | <b>Sim</b>     |
|                                      | Soma das fileiras nas colunas A, B      | 57, 21         |
|                                      | Mann-Whitney U                          | 0              |
|                                      | Média da coluna A                       | 100.0, n=6     |
| Diferenças entre as médias           | Média da coluna B                       | 99.99, n=6     |
|                                      | Diferença: Atual                        | -0.0075        |
|                                      | Diferença: <i>Hodges-Lehmann</i>        | -0.008         |